

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 930 133**

51 Int. Cl.:

G01N 27/447 (2006.01)

B01L 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.03.2011** **E 20160902 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.08.2022** **EP 3690433**

54 Título: **Biochip con almacenamiento de reactivo**

30 Prioridad:

09.03.2010 US 33974310 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
07.12.2022

73 Titular/es:

ANDE CORPORATION (100.0%)
266 Second Avenue
Waltham, MA 02451, US

72 Inventor/es:

SELDEN, RICHARD F. y
TAN, EUGENE

74 Agente/Representante:

MILTENYI, Peter

ES 2 930 133 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

Biochip con almacenamiento de reactivo

Antecedentes de la invención

El campo de la microfluídica se puede definir ampliamente como relacionado con la manipulación de pequeños volúmenes fluidicos, normalmente aquellos que son inferiores a un mililitro. El concepto de que el uso de volúmenes microfluídicos en ensayos críticos representaría una mejora significativa con respecto a los métodos convencionales se remonta a finales de los años 60 y principios de los 70. Aunque los que trabajaban en el campo apreciaron que los análisis de pequeño volumen conducirían a instrumentos portátiles que requerían menos espacio en el laboratorio, una mejor precisión y exactitud, un mayor rendimiento, reducción de costes y compatibilidad con la verdadera automatización, los sistemas desarrollados en ese momento eran sencillos y no se obtenían las ventajas deseadas de la microfluídica. Un sistema inicial se basó en el análisis de 1 a 10 μ l de muestra y 70 a 110 μ l de reactivos que se transfirieron y mezclaron en un pequeño rotor centrífugo (Anderson, N. (1969). Computer interfaced fast analyzers. Science 166: 317-24; y Burtis, C et al. (1972). Development of a miniature fast analyzer. Clinical Chemistry 18: 753-61). Es probable que ese rotor fuera el primer biochip microfluídico informado.

En 1990, la base teórica del campo de la microfluídica fue caracterizado adicionalmente por Manz, que acuñó la expresión "sistema de análisis químico total miniaturizado" o " μ -TAS", para definir lo que él consideraba que debía ser la próxima generación de dispositivos microfluídicos. Manz propuso que dichos dispositivos debían ser capaces de realizar todas las etapas necesarias de manipulación de muestras. Los objetivos establecidos por Manz ayudaron a establecer el principal objetivo en la era moderna de la microfluídica: ofrecer un sistema de análisis total, es decir, totalmente integrado, capaz de realizar una serie compleja de etapas del proceso, la inserción de una muestra hasta la generación de un resultado sin intervención de operario. Es la promesa de integrar una compleja serie de manipulaciones de muestras y etapas de proceso lo que ha llevado a la adopción generalizada de la expresión "laboratorio en un chip".

El trabajo sobre los sistemas centrífugos continuó después de los primeros esfuerzos y dio lugar a un sistema centrífugo comercial para inmunoensayos de tipo sándwich que usaba una unidad de disco compacto microfluídico. Sin embargo, el sistema no estaba completamente integrado; y debería denominarse más exactamente estación de trabajo en la que los reactivos se transfirieron robóticamente desde y hacia el disco compacto. Además, los inmunoensayos eran muy sencillos, basados en hacer pasar una muestra a través de una columna de captura. Aunque el sistema usó volúmenes microfluídicos para reducir los costes de reactivos, no cumplió ni la promesa de la microfluídica de proporcionar un sistema totalmente integrado ni la promesa de la microfluídica de integrar una serie compleja de manipulaciones de muestras y etapas del proceso.

Similarmente, otros investigadores fabricaron un biochip giratorio de poli(metacrilato de metilo) [PMMA] mediante gofrado suave para fraccionar el plasma de la sangre completa. Ha habido aplicaciones de biochips microfluídicos giratorios para la medición diversos analitos de interés en una muestra de sangre. Sin embargo, los dispositivos se han desarrollado para ensayos analíticos sencillos, por ejemplo, establecer las cantidades de analitos de interés en una muestra de sangre. Las muestras no se someten a una serie compleja de manipulaciones de muestras y etapas del proceso, e incluso después de casi dos décadas de desarrollo, todavía puede haber problemas de fiabilidad significativos correlacionados con ensayos convencionales establecidos.

En general, los biochips basados en CD tienen grandes inconvenientes y limitaciones. En primer lugar, no permiten suficiente complejidad del proceso. Estos biochips se limitan a procesos relativamente sencillos, tales como determinadas separaciones celulares (que sirven de reemplazos para la instrumentación de centrifugación convencional) y para inmunoensayos de alto rendimiento (que sirven de reemplazos para la mezcla e incubación de ensayos convencionales). En segundo lugar, el uso de la fuerza centrífuga como el impulsor del transporte fluido es limitante. Por ejemplo, el requisito de girar el biochip impone profundas limitaciones a la estrategia de la manipulación de las muestras - bien porque la muestra debe ser introducida indirectamente (lo que requiere una intervención manual o instrumentación adicional) o directamente (por ejemplo, un tubo de recogida de sangre o hisopo también tendría que someterse a centrifugación). Además, el flujo del proceso en los biochips giratorios prosigue unidireccionalmente, y el radio del biochip limita el área disponible para que tengan lugar las etapas del proceso de muestra (uno de los factores que limita la complejidad del proceso).

Simultáneamente, se han estudiado alternativas a los biochips basados en CD. Diversos grupos han trabajado en biochips microfluídicos basados en placas de microtitulación usando las normas de la SBS (Society for Biomolecular Screening, Microplate Standards Development Committee, ANSI/SBS1, Danbury, CT, 2004). La SBS desarrolló una serie de normas publicadas para placas de microtitulación que incluyen la huella (127,76 por 85,48 mm, 10.920,9 mm²), la altura y las dimensiones del reborde exterior inferior y posiciones de los pocillos. Estas normas han sido incorporadas por los fabricantes comerciales y grupos académicos, independientemente del proceso de fabricación utilizado. Las placas de microtitulación microfluídicas se han desarrollado para diversos procesos, incluyendo la purificación de ADN y la cristalización de proteínas. Estos biochips requieren un procesamiento previo de la muestra antes de la introducción, realizan solo dos etapas del proceso de purificación de ADN y no realizan ningún análisis

del producto de ADN del proceso.

Similarmente, otros grupos han usado placas microfluídicas rectangulares basadas en las normas de la SBS para tareas tales como la mezcla de reactivos de volumen de nanolitros, intercambio de medio durante la microscopía de células vivas, y reparto de células y reactivos. Incluso otros investigadores han adaptado biochips rectangulares para su uso en sistemas robóticos para el reparto a alto rendimiento de reactivos en los pocillos. Otro grupo desarrolló un biochip rectangular para la detección de proteínas mediante amplificación de señales biológicas en un dispositivo de un pocillo en otro.

En el avance del desarrollo de biochips, se han comercializado diversos productos de "circuito fluido integrado" basados en el uso de características microfluídicas en un formato de la SBS. Por ejemplo, un biochip realiza el genotipado de polimorfismos de un solo nucleótido (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) usando una matriz que pueda interrogar a 48 muestras para cada uno de los 48 SNP. El proceso se lleva a cabo preparando, en primer lugar, ADN purificado y mezclas de reacción fuera de la placa microfluídica, colocando la placa en un controlador, cebando la placa, cargando y mezclando los reactivos durante 45 minutos en la placa, colocando la placa en un termociclador para PCR y transfiriendo la placa a un instrumento de detección de fluorescencia. Estos biochips requieren un procesamiento previo de la muestra antes de la introducción, requieren diversas etapas manuales durante el procesamiento de las muestras en el chip, no incorporan reactivos y no realizan ningún análisis del producto de ADN del proceso.

Un enfoque comercial similar mide la adhesión de las plaquetas usando una tecnología microfluídica de placa con pocillos que integra dispositivos de celdas de flujo a escala micrométrica en placas de pocillos de la norma de la SBS. El proceso requiere diversas etapas de procesamiento previo, incluidas la introducción manual de una proteína de interés para recubrir los canales microfluídicos, la perfusión de los canales, el lavado, la preparación manual de la muestra celular de interés, la adición de la muestra celular a los canales microfluídicos y la colocación de la placa en una estación de trabajo para su posterior procesamiento y análisis. Se ha aplicado un enfoque similar para estudiar la cicatrización de heridas exponiendo células epiteliales a una variedad de compuestos. Estos biochips requieren un exhaustivo procesamiento previo de la muestra antes de la introducción.

Gran parte del biochip microfluídico de la técnica anterior se basa en el uso de materiales tales como el silicio o el vidrio para fabricar biochips. Sin embargo, los biochips de silicio y vidrio son prohibitivamente caros de fabricar para aplicaciones comerciales de alto volumen (un solo biochip puede costar hasta miles de dólares) y, por lo tanto, no son prácticos para ser desechables de un solo uso. Asimismo, la necesidad de reutilizar estos biochips conduce a problemas de contaminación entre cada ejecución (un problema para la identidad y el diagnóstico clínico en seres humanos), problemas con la complejidad de la instrumentación si los biochips están preparados para su reutilización en el instrumento y problemas con la logística si los biochips están preparados para su reutilización fuera del instrumento.

El documento de patente US 2005/093087 desvela un dispositivo microestructurado para el almacenamiento extraíble de pequeñas cantidades de líquido; el dispositivo tiene un soporte y una primera cavidad con al menos una primera sección para el almacenamiento de una pequeña cantidad de líquido; la primera sección de la primera cavidad está moldeada en el soporte y está cerrada con un elemento de cubierta y un elemento de bloqueo; el dispositivo tiene un medio para la transmisión de una fuerza desde el elemento de cubierta hasta el elemento de bloqueo que destruye la conexión entre el elemento de bloqueo y el soporte o destruye el elemento de bloqueo en sí de manera que la cantidad de líquido pueda ser retirada de la primera sección de la cavidad.

El documento de patente US 2006/076068 se refiere a estructuras microfluídicas de plástico que tienen un diafragma sustancialmente rígido que actúa entre un estado relajado, en donde el diafragma se asienta contra la superficie de un sustrato, y un estado actuado, en donde el diafragma se aleja del sustrato.

El documento de patente US 2004/241042 describe un dispositivo microfluídico que contiene reactivos líquidos que tienen una vida en anaquel prolongada; los reactivos líquidos están en microdepósitos que limitan el escape de humedad a menos del 10 % durante la vida en anaquel del dispositivo; el microdepósito puede estar hecho de polipropileno y cubierto con una película de plástico metalizado.

Para darse cuenta del potencial insatisfecho de la microfluídica, se necesitan biochips y sistemas microfluídicos que sean capaces de realizar una serie compleja de etapas de procesamiento para una o más muestras en paralelo en el marco de un sistema totalmente integrado, desde la introducción de las muestras hasta la obtención de resultados, en el que no se requiera la manipulación por un operario. Sin embargo, los biochips desarrollados hasta la fecha solo realizan un subconjunto de las etapas necesarias para el análisis, no pueden realizar series complejas de etapas de procesamiento y no son capaces de producir resultados analíticos en un solo dispositivo. Además, estos biochips y sistemas usan materiales y métodos inadecuados para la fabricación en serie.

Sumario de la invención

En general, la tecnología descrita en el presente documento se refiere a biochips que tienen la integración de todas

las etapas en un proceso complejo desde la inserción de una muestra hasta la generación de un resultado, realizado sin intervención de un operario. Un biochip puede incluir características microfluídicas y macrofluídicas sobre las que actúan los subsistemas de instrumentos en una serie de etapas de procesamiento. El biochip y el recipiente de almacenamiento de reactivo para un biochip según la invención se definen en las reivindicaciones adjuntas 1 a 9, respectivamente. Las siguientes secciones describen para fines ilustrativos otros aspectos que no se encuentran dentro del alcance de la invención reivindicada.

Se desvelan además métodos de fabricación de biochips complejos que incluyen un densidad de alta característica. El método incluye el moldeo por inyección de materiales de plástico para formar el biochip.

Se desvela además un biochip, que tras la inserción en un instrumento de electroforesis que tiene subsistemas neumático, térmico, de alta tensión y óptico, y un controlador de proceso, genera un perfil de3 secuenciación o de tamaño de ácido nucleico de al menos una muestra. El biochip incluye: un subconjunto de procesamiento macrofluídico en relación con un subconjunto fluido y un subconjunto neumático. El subconjunto de procesamiento macrofluídico incluye al menos una cámara adaptada para recibir una muestra. El subconjunto fluido incluye una placa fluidica, y al menos un canal de transporte de fluidos y una cámara de amplificación adaptada para conectarse al subsistema térmico. El subconjunto neumático está adaptado para conectarse al subsistema neumático del instrumento y a los subconjuntos del biochip. El subconjunto neumático incluye una placa neumática y una o una pluralidad de líneas de conducción para conducir neumáticamente fluidos siguiendo las instrucciones de dicho controlador de proceso. El biochip también incluye un subconjunto de separación y detección adaptado para conectarse a los subsistemas de alta tensión y óptico y al controlador de proceso en el instrumento. El subconjunto de separación y detección incluye un canal de separación y una región de detección situada para enviar señales desde cada uno de los canales al subsistema óptico en el instrumento. El biochip es de plástico, estacionario y unitario, y la huella de las placas fluidicas y/o neumáticas tiene aproximadamente 86 mm por 128 mm o mayor (por ejemplo, aproximadamente 100 × 150 mm o mayor, aproximadamente 115 × 275 mm o mayor, aproximadamente 115 × 275 mm o mayor, aproximadamente 140 × 275 o mayor, 165 × 295 o mayor).

Se desvela además un biochip, que al insertarlo en un instrumento de electroforesis que tiene subsistemas neumático, térmico, de alta tensión y óptico, y un controlador de proceso, genera un perfil de secuenciación o de tamaño de ácido nucleico de al menos una muestra. El biochip incluye: un subconjunto de procesamiento macrofluídico en relación con un subconjunto fluido y un subconjunto neumático. El subconjunto de procesamiento macrofluídico incluye al menos una cámara adaptada para recibir una muestra. El subconjunto fluido incluye una placa fluidica, y al menos un canal de transporte de fluidos y una cámara de amplificación adaptada para conectarse al subsistema térmico. El subconjunto neumático está adaptado para conectarse al subsistema neumático del instrumento y a los subconjuntos del biochip. El subconjunto neumático incluye una placa neumática y una o una pluralidad de líneas de conducción para conducir neumáticamente fluidos siguiendo las instrucciones de dicho controlador de proceso. El biochip también incluye un subconjunto de separación y detección adaptado para conectarse a los subsistemas de alta tensión y óptico y al controlador de proceso en el instrumento. El subconjunto de separación y detección incluye un canal de separación y una región de detección situada para enviar señales desde cada uno de los canales al subsistema óptico en el instrumento. El biochip es de plástico, estacionario y unitario, y la huella de las placas fluidicas y/o neumáticas es inferior a 10.920,0 mm² y no cumple las normas de la SBS.

Se desvela además un biochip, que al insertarlo en un instrumento de electroforesis que tiene subsistemas neumático, térmico, de alta tensión y óptico, y un controlador de proceso, genera un perfil de secuenciación o de tamaño de ácido nucleico de al menos una muestra. El biochip incluye un subconjunto de procesamiento macrofluídico en relación con un subconjunto de fluidos y un subconjunto neumático. El subconjunto de procesamiento macrofluídico incluye al menos una característica macrofluídica localizada en su interior o en el mismo y una cámara capaz de recibir una muestra. El subconjunto fluido incluye una placa fluidica, y al menos una característica localizada en su interior o en el mismo. El subconjunto fluido comprende además al menos un canal de transporte de fluidos y una cámara de amplificación adaptada para conectarse al subsistema térmico. El subconjunto neumático está adaptado para conectarse al subsistema neumático del instrumento y a los subconjuntos del biochip. El subconjunto neumático incluye una placa neumática y al menos una característica localizada en su interior o en el mismo. El subconjunto neumático incluye además una o una pluralidad de líneas de conducción para conducir neumáticamente fluidos siguiendo las instrucciones de dicho controlador de proceso. El biochip también incluye un subconjunto de separación y detección adaptado para conectarse a los subsistemas de alta tensión y óptico y al controlador de proceso en el instrumento. El subconjunto de separación y detección incluye al menos una característica localizada en su interior en el mismo. El subconjunto de separación y detección incluye además un canal de separación y una región de detección situada para enviar señales desde cada uno de los canales al subsistema óptico del instrumento. El biochip es de plástico, estacionario y unitario, y un estado físico de la una o más características de los subconjuntos fluido, neumático y/o de separación y detección, está adaptado para cambiar en procesos programados de 25 o más etapas (por ejemplo, 50 o más, 100 o más, 200 o más.) En algunas realizaciones, las etapas programadas del proceso dan como resultado dos o más etapas de procesamiento resultantes que se producen en el biochip.

Se desvela además un biochip unitario, estacionario, que al insertarlo en un instrumento de electroforesis que tiene subsistemas neumático, térmico, de alta tensión y óptico, y un controlador de proceso, genera un perfil de secuenciación o de tamaño de ácido nucleico de al menos una muestra. El biochip incluye un subconjunto de procesamiento macrofluídico en relación con un subconjunto fluídico y un subconjunto neumático. El subconjunto de procesamiento macrofluídico incluye al menos una cámara adaptada para recibir una muestra. El subconjunto fluídico incluye una placa fluídica que tiene una hoja termoplástica estampada superior e inferior unida a la misma, para formar al menos un canal de transporte de fluido a cada lado de la placa y una cámara de amplificación adaptada para conectarse al subsistema térmico. El subconjunto neumático está adaptado para conectarse al subsistema neumático del instrumento, y a los subconjuntos de dicho biochip. El subconjunto neumático incluye una placa neumática que tiene una hoja termoplástica estampada superior unida a la misma, y una o una pluralidad de líneas de conducción para conducir neumáticamente fluidos siguiendo las instrucciones del controlador de proceso. El biochip también incluye un subconjunto de válvula, situado entre y conectado a los subconjuntos fluídicos y neumáticos y un subconjunto de separación y detección adaptado para conectarse a los subsistemas de alta tensión y óptico y al controlador de proceso del instrumento. El subconjunto de separación y detección incluye al menos un canal de separación, y comprende además una región de detección situada para enviar señales desde cada uno de los al menos un canal de separación al subsistema óptico de dicho instrumento.

Algunos de estos aspectos de la tecnología incluyen una o más de las siguientes características. Uno o más de los subsistemas macrofluídico, neumático, fluídico y de separación y detección están formados por plástico. El subconjunto de la válvula incluye al menos una válvula elastomérica. El subconjunto de válvula incluye al menos una válvula no elastomérica. El subconjunto de separación y detección está orientado de tal manera que la electroforesis de la muestra dentro del subconjunto de separación y detección se realiza en la dirección opuesta de un flujo general de muestra a través de la placa fluídica. El biochip incluye todos los reactivos necesarios para procesar la al menos una muestra dentro del biochip.

Además, se desvela un sistema para procesar una muestra biológica. El sistema incluye un biochip y un controlador de proceso. Al introducir el biochip en un instrumento de electroforesis que tiene subsistemas neumático, térmico, de alta tensión y óptico, y el controlador de proceso, se genera un perfil de secuenciación o de tamaño de ácido nucleico de al menos una muestra. El biochip incluye un subconjunto de procesamiento macrofluídico en relación con un subconjunto fluídico y un subconjunto neumático. El subconjunto de procesamiento macrofluídico incluye al menos una cámara adaptada para recibir una muestra. El subconjunto fluídico incluye una placa fluídica que tiene una hoja termoplástica estampada superior e inferior unida a la misma, para formar al menos un canal de transporte de fluido a cada lado de la placa y una cámara de amplificación adaptada para conectarse al subsistema térmico. El subconjunto neumático que está adaptado para conectarse al subsistema neumático de dicho instrumento, y a los subconjuntos de dicho biochip, incluye una placa neumática que tiene una hoja termoplástica estampada superior unida a la misma, y una o una pluralidad de líneas de conducción para conducir neumáticamente fluidos siguiendo las instrucciones del controlador de proceso. El biochip también incluye un subconjunto de válvula situado entre y conectado a dichos subconjuntos fluídico y neumático y un subconjunto de separación y detección adaptado para conectarse a los subsistemas de alta tensión y óptico y al controlador de proceso del instrumento. El subconjunto de separación y detección incluye al menos un canal de separación, y una región de detección situada para enviar señales desde cada uno de al menos uno de los canales de separación al subsistema óptico del instrumento. El controlador de proceso del instrumento incluye instrucciones para realizar 25 o más etapas de proceso programadas y automatizadas.

Se desvela además un método de fabricación de un biochip. El método incluye el moldeo por inyección de una placa fluídica para que incluya una superficie superior fluídica, una superficie inferior fluídica y al menos un orificio de paso que se extiende desde la superficie superior fluídica a la superficie inferior fluídica para conectar la superficie superior fluídica con la superficie inferior fluídica. Cada una de las superficies superior e inferior fluídica incluye una pluralidad de características microfluídicas. El método incluye además el moldeo por inyección de una placa neumática para que incluya una superficie superior neumática, una superficie inferior neumática y al menos un orificio de paso que se extiende desde la superficie superior neumática a la superficie inferior neumática para conectar la superficie superior con la superficie inferior neumática. Cada una de las superficies superior e inferior neumática comprende una pluralidad de características microfluídicas. El método también incluye alinear las placas neumáticas y fluídicas para formar el biochip, en donde una huella de las placas fluídica y/o neumática tiene 86 mm por 128 mm o mayor, y al menos una de la pluralidad de características microfluídicas de la placa fluídica y/o de la placa neumática incluye un ángulo de inclinación menor de 2 grados.

Se desvela además un método para realizar una electroforesis automatizada desde la introducción de las muestras hasta la obtención de los resultados en al menos una muestra sin procesar en un biochip unitario que tiene un subconjunto de procesamiento macrofluídico en comunicación fluida con un subconjunto fluídico y un subconjunto neumático. El método incluye: (a) insertar la al menos una muestra sin procesar en una cámara en el subconjunto de procesamiento macrofluídico; (b) insertar el biochip en un instrumento que tiene un subsistema neumático, un subsistema térmico, un subsistema de alta tensión, un sistema óptico y un controlador de proceso que puede aceptar un programa de proceso predefinido e implementar el programa de proceso automáticamente al leer el programa del proceso y controlar el subsistema neumático, un subsistema térmico, un subsistema de alta tensión y un sistema óptico; (c) activar el controlador de proceso para llevar a cabo el programa del proceso, incluyendo el

programa del proceso instrucciones para: (i) inicializar el biochip aplicando presión desde el subsistema neumático a las líneas de válvula del subconjunto neumático o en comunicación fluida con el subconjunto neumático; (ii) purificar el ADN de la muestra no procesada aplicando presión desde el subsistema neumático al subconjunto de procesamiento macrofluido para liberar los reactivos almacenados en su interior, aplicar una presión desde el subconjunto de procesamiento macrofluido a los reactivos liberados para formar un lisado celular de la muestra no procesada, aplicar una presión desde el subsistema neumático para extraer el lisado a través de un filtro de purificación en el subconjunto fluido en una cámara de contención para unir el ADN en el lisado con el filtro, aplicar una presión desde el subsistema neumático para liberar una disolución de lavado almacenada en el subconjunto de procesamiento macrofluido para que fluya a través del filtro de purificación para eliminar contaminantes del ADN unido; aplicar una presión para que el aire fluya a través del filtro de purificación para secar el ADN unido, aplicar una presión desde el subsistema neumático para liberar una disolución de elución almacenada en el subconjunto de procesamiento macrofluido para liberar el ADN unido del filtro de purificación, generar un eluido que contenga el ADN purificado; (iii) transportar el eluido a una cámara de reconstitución que contiene una mezcla de reacción de PCR liofilizada aplicando presión desde el subsistema neumático al subconjunto neumático; (iv) transportar la mezcla de reacción de PCR reconstituida a una cámara de termociclado en el subconjunto fluido; (v) aplicar calor a la cámara de termociclado iniciando un protocolo de termociclado para generar amplicones marcados a partir de la mezcla de PCR; (vi) transportar los amplicones marcados y un reactivo de formamida almacenado en el subconjunto de procesamiento macrofluido a una cámara de unión en el subconjunto fluido aplicando presión desde el subsistema neumático al subconjunto neumático; formando los amplicones marcados y el reactivo de formamida una mezcla de producto de formamida-PCR y; (vii) transportar la mezcla de producto de formamida-PCR aplicando una presión desde el sistema neumático al subconjunto neumático para hacer fluir la mezcla a una cámara de torta de ILS para mezclar con una torta de ILS para generar una muestra de separación y detección; (viii) transportar la muestra de separación y detección a una cámara de cátodo dentro del subconjunto fluido aplicando una presión desde el subsistema neumático al subconjunto neumático; (ix) preparar el cátodo y el ánodo del subconjunto fluido para la separación de la muestra de separación y detección aplicando una tensión desde el subsistema de alta tensión para polarizar el cátodo y el ánodo; (x) transportar gel desde un depósito de reactivo de gel en el subconjunto fluido a una cámara de cátodo y una cámara de residuos del subconjunto fluido mediante la aplicación de presión desde el subsistema neumático al subconjunto neumático; (xi) inyectar y separar la muestra de separación y detección en el canal de separación aplicando una tensión a través del subsistema de alta tensión a un cátodo y ánodo; y (xii) efectuar la fluorescencia de los componentes separados de la muestra de separación y detección activando un láser en el subsistema óptico. El método también incluye detectar automáticamente una señal fluorescente de los componentes separados para proporcionar resultados de muestras de separación y detección de al menos una muestra no procesada.

Se desvela además un sistema para proporcionar al menos dos tipos de procesamiento desde la inserción de muestras hasta la obtención de resultados para al menos una muestra biológica. El sistema incluye un biochip estacionario y un instrumento que incluye subsistemas neumático, térmico, de alta tensión y óptico para la interfaz con el biochip, y un controlador de proceso. El biochip estacionario incluye un subconjunto de procesamiento macrofluido en relación con un subconjunto fluido y un subconjunto neumático. El subconjunto de procesamiento macrofluido que incluye al menos una cámara adaptada para recibir una muestra. El subconjunto fluido incluye una placa fluida, y al menos un canal de transporte de fluidos y una cámara de amplificación adaptada para conectarse al subsistema térmico. El subconjunto neumático que está adaptado para conectarse al subsistema neumático de dicho instrumento, y a los subconjuntos de dicho biochip, incluye una placa neumática y una o una pluralidad de líneas de conducción para conducir neumáticamente fluidos siguiendo las instrucciones del controlador de proceso. El biochip también incluye un subconjunto de separación y detección adaptado para conectarse a los subsistemas de alta tensión y óptico y al controlador de proceso en el instrumento. El subconjunto de separación y detección incluye un canal de separación y una región de detección situada para enviar señales desde cada uno de los canales al subsistema óptico en el instrumento. El biochip incluye además al menos dos trayectorias distintas para el procesamiento de muestras. Cada una de las al menos dos trayectorias distintas está destinada a diferentes procesos analíticos. El controlador de proceso del instrumento incluye un conjunto de instrucciones para procesar la al menos una muestra biológica en los diferentes procesos analíticos. En algunas realizaciones, los diferentes procesos analíticos son el análisis de STR y el análisis de polimorfismos de un solo nucleótido. En algunas realizaciones, los diferentes procesos analíticos son la amplificación multiplexada y la secuenciación del ADN. En algunas realizaciones, los diferentes procesos analíticos son el análisis de STR y la secuenciación de ADN mitocondrial. En algunas realizaciones, los diferentes procesos analíticos son PCR con transcripción inversa y PCR convencional. En algunas realizaciones, los diferentes procesos analíticos son secuenciación del ADN y análisis de polimorfismos de un solo nucleótido.

En otro aspecto, la tecnología se refiere a un recipiente de almacenamiento de reactivo para un biochip que incluye un bloque macrofluido y una cubierta. El bloque macrofluido incluye una cámara de almacenamiento de reactivo que tiene un extremo superior y un extremo inferior; un primer sello de lámina unido al extremo inferior; y un segundo sello de lámina unido al extremo superior. En la cámara sellada con láminas se almacena un reactivo y se libera mediante la aplicación de presión neumática a través de la cubierta de tal manera que las láminas superior e inferior estallan, liberando el contenido de la cámara de almacenamiento de reactivo, como se especifica adicionalmente en las reivindicaciones.

Las realizaciones del aspecto anterior pueden incluir una o más de las siguientes características. En algunas realizaciones, el recipiente de almacenamiento de reactivo está conectado a un subconjunto fluido. En algunas realizaciones, el recipiente de almacenamiento de reactivo incluye además una placa espaciadora colocada entre el recipiente y el subconjunto fluido, de tal manera que la placa espaciadora tiene un tamaño que admite la expansión de la primera lámina antes de estallar.

Existen numerosas ventajas de la presente tecnología, que incluyen, pero no se limitan a, una intervención mínima o nula del operario y costes de fabricación reducidos.

10 Descripción de los dibujos

Las ventajas de la tecnología descrita anteriormente, junto con otras ventajas, pueden entenderse mejor remitiéndose a la siguiente descripción tomada junto con los dibujos adjuntos. Los dibujos no están necesariamente a escala, sino que se hace hincapié en ilustrar los principios de la tecnología.

La Figura 1 es una vista esquemática lateral de una realización de un dispositivo de almacenamiento y liberación de reactivos de un solo tubo.

La Figura 2 es una fotografía de una realización de una placa espaciadora incluida en una realización de un conjunto de biochips de 5 muestras que utiliza un estallido de liberación de almacenamiento de reactivo.

La Figura 3 es una vista esquemática transversal de una parte de una placa espaciadora.

La Figura 4 es un gráfico de la presión de estallido frente al diámetro de la cámara de las láminas de aluminio de varios espesores.

La Figura 5 es una vista esquemática en perspectiva de una unidad de liberación de almacenamiento de reactivo que incluye seis cámaras de almacenamiento de reactivo.

La Figura 6 es una vista desde arriba en perspectiva de la unidad de liberación de almacenamiento de reactivo de la Figura 5 que muestra una lámina superior unida a un extremo superior de cada cámara.

La Figura 7 es una ilustración en vista desde arriba de dos láminas de una unidad de liberación de almacenamiento de reactivo después del estallido.

La Figura 8 es una vista esquemática superior de una realización de una estructura de válvula elastomérica accionada neumáticamente.

La Figura 9 es una vista esquemática transversal de la estructura de válvula accionada neumáticamente de la Figura 8.

La Figura 10 es una vista esquemática superior de una realización de una válvula de membrana elastomérica con cinta ASP.

La Figura 11 es una vista esquemática transversal de la válvula de la reivindicación 10.

La Figura 12 es una vista esquemática superior de una realización de una válvula accionada neumáticamente con una membrana de válvula rígida.

La Figura 13 es una vista transversal de la válvula accionada neumáticamente con la membrana de válvula rígida de la Figura 12.

La Figura 14 es una vista esquemática superior de una realización de una válvula de membrana elastomérica sujeta con abrazaderas.

La Figura 15 es una vista en sección transversal de la válvula de membrana elastomérica sujeta con abrazaderas de la Figura 12.

La Figura 16 es una vista esquemática transversal de una configuración de la membrana de ventilación utilizada en una realización de un biochip según la presente tecnología.

La Figura 17 es una vista esquemática transversal de una configuración de membrana de ventilación utilizada en otra realización de un biochip según la presente tecnología.

La Figura 18 es una vista esquemática superior de una placa neumática con el colector y las áreas circundantes extendidas de una realización de un biochip según la presente tecnología.

La Figura 19 es una vista esquemática inferior de una placa neumática con el colector y las áreas circundantes extendidas de una realización de un biochip según la presente tecnología.

- 5 La Figura 20 es una vista esquemática transparente de una placa fluidica con la región de purificación y las áreas circundantes extendidas de una realización de un biochip según la presente tecnología.

La Figura 21 es una fotografía de un cilindro activado neumáticamente utilizado para ejercer una fuerza controlada sobre un biochip.

- 10 La Figura 22 es un gráfico de barras que compara la intensidad de la señal en cada locus de STR para diversas presiones aplicadas al biochip por el cilindro activado neumáticamente de la Figura 21. En el gráfico, se aplicaron presiones de 5,17, 7,72, 1.289, 1.544, 2.062 y 2.317 kPa (75, 112, 187, 224, 299 y 336 psig)*, y, para cada locus, se registraron las intensidades de la señal para cada presión (presiones crecientes de izquierda a derecha).

15 *: 5,2, 7,7, 12,9, 15,4, 20,6 y 23,2 bares

La Figura 23 es una vista esquemática superior de una realización de un biochip moldeado por inyección según la presente tecnología.

- 20 La Figura 24 es una vista esquemática superior de una realización de la capa fluidica 1 de un biochip según la presente tecnología.

La Figura 25 es una vista esquemática superior de una realización de una capa fluidica 2 de un biochip según la presente tecnología.

- 25 La Figura 26 es una vista esquemática superior de una realización de una capa neumática 1 de un biochip según la presente tecnología.

La Figura 27 es una vista esquemática superior de una realización de una capa neumática 2 de un biochip según la presente tecnología.

- 30 La Figura 28 es una vista esquemática superior transparente de una realización de un subconjunto fluidico que incluye la primera placa fluidica de la Figura 24 unida a la segunda placa fluidica de la Figura 25.

35 La Figura 29 es una vista esquemática superior transparente de una realización de un subconjunto neumático que incluye la primera placa neumática de la Figura 26 unida a la segunda placa neumática de la Figura 27.

La Figura 30 es una vista esquemática superior transparente de un biochip formado por la fijación del subconjunto neumático de la Figura 29 al subconjunto fluidico de la Figura 28.

- 40 La Figura 31 es una fotografía de una realización de un instrumento de ciclado neumático y termociclado para su uso en relación con biochips.

45 La Figura 32 es un perfil de STR para un análisis de PCR de una muestra dentro de un biochip según la presente tecnología.

La Figura 33 es una vista esquemática superior de una realización de una placa fluidica incluida en una realización de un conjunto fluidico según la presente tecnología.

- 50 La Figura 34 es una vista esquemática inferior de la placa fluidica de la Figura 33.

La Figura 35 es una vista esquemática transparente de la placa fluidica que muestra las características de los lados superior e inferior de la placa.

- 55 La Figura 36 es una vista esquemática superior de una realización de una película fina estampada para fijarse a la parte superior de la placa fluidica.

La Figura 37 es una vista esquemática inferior de una realización de una película fina estampada para fijarse a la parte inferior de la placa fluidica.

- 60 La Figura 38 es una vista esquemática superior de una realización de una placa fluidica con una línea que ilustra una trayectoria que una sola muestra toma a través de la placa fluidica.

65 La Figura 39 es una vista esquemática superior ampliada de la placa fluidica de la Figura 38 que muestra una parte de la trayectoria a través de una región de purificación.

La Figura 40 es una vista esquemática superior ampliada de la placa fluidica de la Figura 38 que muestra una parte de la trayectoria a través de una región de amplificación.

- 5 La Figura 41 es una vista esquemática superior ampliada de la placa fluidica de la Figura 38 que muestra una parte de la trayectoria a través de una región de separación y detección.

La Figura 42 es una vista esquemática superior de una realización de una placa neumática incluida en una realización de un conjunto neumático según la presente tecnología.

10

La Figura 43 es una vista esquemática inferior de la placa neumática de la Figura 42.

La Figura 44 es una vista transparente de la placa neumática de la Figura 42 que muestra las características de los lados superior e inferior de la placa neumática.

15

La Figura 45 es una vista esquemática superior de una realización de una película fina estampada para fijarse al lado superior de la placa neumática.

20

La Figura 46 es una vista esquemática inferior de una realización de una película fina estampada para fijarse al lado inferior de la placa neumática.

La Figura 47 es una vista esquemática transparente de una realización del bloque macrofluidico incluido en una realización de un subconjunto de procesamiento macrofluidico.

25

La Figura 48 es una vista esquemática superior de una realización de una capa superior de una cubierta para el bloque macrofluidico.

La Figura 49 es una vista esquemática inferior de una realización de una capa superior de la cubierta.

30

La Figura 50 es una vista esquemática superior transparente de la capa superior de la cubierta.

La Figura 51 es una vista esquemática superior de otra realización de una segunda capa de una cubierta para el bloque macrofluidico.

35

La Figura 52 es una vista esquemática superior de otra realización de una tercera capa de una cubierta para el bloque macrofluidico.

La Figura 53 es una vista esquemática inferior de una realización de una tercera capa para la cubierta de la Figura 52.

40

La Figura 54 es una vista esquemática superior transparente de una tercera capa para la cubierta.

La Figura 55 es una vista esquemática superior de una realización de un biochip de separación y detección para inyección a presión.

45

La Figura 56 es una vista esquemática superior de una realización de un biochip de separación y detección para la inyección cruzada para el transporte electrocinético de una muestra.

La Figura 57 es una vista esquemática lateral de una realización de un biochip según la presente tecnología.

50

La Figura 58 es una fotografía de una realización de un conjunto de biochip según la presente tecnología e incluye flechas que indican la dirección de los flujos del proceso.

La Figura 59 es una fotografía del ensamblaje del biochip de la Figura 58. El conjunto de biochip interactúa con un subsistema óptico, un subsistema térmico, un subsistema de alta tensión y un subsistema neumático, y con un subsistema de control del proceso.

55

La Figura 60 es un electroferograma de control generado para la muestra de control ILS (fragmentos marcados con fluorescencia usando ROX) dentro de una realización de un biochip según la presente tecnología.

60

La Figura 61 es un electroferograma que muestra los tamaños de los fragmentos de STR generados para una muestra de hisopo bucal siguiendo un programa automatizado. Cada uno de los colorantes fluorescentes utilizados para marcar los cebadores de STR en la mezcla de reacción de PCR y los ILS se muestran en paneles individuales. En el panel superior se muestran los fragmentos marcados con fluoresceína, los fragmentos marcados con JOE se muestran en el segundo panel desde la parte superior, los fragmentos marcados con TAMRA se muestran en el tercer panel desde la parte superior y los fragmentos ILS marcados con ROX se muestran en el panel inferior.

65

La Figura 62 es una vista esquemática superior de una realización de una placa fluidica de un subconjunto fluidico según la presente tecnología.

5 La Figura 63 es una vista esquemática inferior de la placa fluidica de la Figura 62.

La Figura 64 es una vista esquemática transparente de la placa fluidica que muestra las tanto las características del lado superior de la Figura 62 como las características de lado inferior de la Figura 63.

10 La Figura 65 es una fotografía de una realización de una placa fluidica moldeada por inyección.

La Figura 66 es una vista esquemática superior de una realización de una película fina estampada para fijarse al lado superior de la placa fluidica de la Figura 65.

15 La Figura 67 es una vista esquemática inferior de una realización de una película fina estampada para fijarse al lado inferior de la placa fluidica de la Figura 65.

La Figura 68 es una vista esquemática superior de una realización de una placa fluidica con una línea que ilustra una trayectoria de una sola muestra que pasa por la placa fluidica.

20 La Figura 69 es una vista esquemática superior ampliada de la placa fluidica de la Figura 68 que muestra una parte de la trayectoria a través de una región de purificación.

25 La Figura 70 es una vista esquemática superior ampliada de la placa fluidica de la Figura 68 que muestra una parte de la trayectoria a través de una sección de PCR.

La Figura 71 es una vista esquemática superior ampliada de la placa fluidica de la Figura 68 que muestra una parte de la trayectoria a través de una región de separación y detección.

30 La Figura 72 es una vista esquemática superior de una realización de una placa neumática de un conjunto neumático según la presente tecnología.

La Figura 73 es una vista esquemática inferior de la placa neumática de la Figura 72.

35 La Figura 74 es una vista desde arriba transparente de la placa neumática que muestra los lados superior e inferior de la placa neumática de las Figuras 72 y 73.

La Figura 75 es una fotografía de una realización de una placa neumática moldeada por inyección.

40 La Figura 76 es una vista esquemática superior de una realización de una película fina estampada que se fija a un lado superior de la placa neumática moldeada por inyección de la Figura 75.

La Figura 77 es una tabla que representa una relación de las etapas de procesamiento programadas y las etapas de procesamiento resultantes para una parte de un proceso automatizado para su uso en un biochip.

45 La Figura 78 es un diagrama de flujo de una realización de un circuito microfluidico de división y dilución de muestras.

La Figura 79 es un gráfico que muestra la fluorescencia de fondo de diversos materiales a diferentes espesores.

50 La Figura 80 es una tabla que resume los resultados de los datos de fluorescencia recogidos con y sin filtro de ranura.

Descripción detallada de la invención

55 Los biochips descritos en el presente documento consiguen la meta fundamental del campo de la microfluidica: la integración de todas las etapas en un proceso complejo, desde la inserción de una muestra hasta la generación de un resultado, realizada en un solo instrumento sin que intervenga ningún operario. En un aspecto, los presente inventores presentan en el presente documento novedosos biochips que están completamente integrados y que son capaces de realizar análisis complejos desde que se insertan las muestras hasta que se obtienen los resultados, incluyendo lisis celular, purificación de ADN, amplificación multiplexada y separación y detección electroforética para generar perfiles de repeticiones cortas en tándem (Short Tandem Repeat, STR) a partir de muestras forenses; lisis celular, purificación de ADN, amplificación multiplexada, secuenciación de Sanger, ultrafiltración, y separación y detección electroforética para generar secuencias de ADN a partir de muestras clínicas; purificación de ácido nucleico, transcripción inversa, amplificación multiplexada, secuenciación de Sanger, ultrafiltración, y separación y detección electroforética para generar secuencias de ADN a partir de muestras de amenaza biológica, y purificación

de ácido nucleico, construcción de bibliotecas y secuenciación de moléculas individuales para generar secuencias de ADN genómico a partir de muestras clínicas y de investigación humanas, bacterianas y víricas.

Las manipulaciones de las muestras que se pueden realizar en los biochips de la invención incluyen combinaciones de extracción de ácido nucleico; lisis celular; separación celular; lisis celular diferencial; filtración diferencial; purificación de ácido nucleico total; purificación de ADN; purificación de ARN; purificación de ARNm; purificación de proteínas; depuración anterior a la amplificación de ácido nucleico; amplificación de ácido nucleico (por ejemplo, tanto PCR de punto final simple como múltiple, PCR en tiempo real, PCR con transcripción inversa, PCR asimétrica, PCR anidada, PCR TARDÍA, PCR de contacto, PCR digital, amplificación por círculo rodante, amplificación por desplazamiento de cadena y amplificación por desplazamiento múltiple); amplificación Y-STR; amplificación mini-STR; análisis de polimorfismo de un solo nucleótido; análisis de VNTR; análisis de RFLP; depuración posterior a la amplificación de ácido nucleico; depuración anterior a la secuenciación de ácido nucleico; secuenciación de ácido nucleico (por ejemplo, secuenciación de Sanger, pirosecuenciación y secuenciación de moléculas individuales); depuración posterior a la secuenciación de ácido nucleico; transcripción inversa; depuración anterior a la transcripción inversa; depuración posterior a la transcripción inversa; ligamiento de ácido nucleico; análisis de SNP; hibridación de ácido nucleico; separación y detección electroforética; inmunoensayos; ensayos de unión; ensayos de proteínas; ensayos enzimáticos; espectroscopia de masas; y cuantificación de ácidos nucleicos y proteínas.

Cuando se caracteriza la estructura y las funciones de un biochip, se pueden tener en cuenta al menos dos clases de complejidad. La complejidad del número de muestras se refiere al número de muestras independientes que se procesa en el biochip. La complejidad del proceso se refiere al número de manipulaciones secuenciales a las que se somete cada muestra (y subproductos de muestra) en el biochip. Los biochips de la invención tienen altos niveles tanto de número de muestras como de complejidad del proceso.

En otro aspecto, los novedosos biochips de la invención integran una gran cantidad de etapas de procesamiento para obtener un sistema totalmente integrado desde que se introducen las muestras hasta que se obtienen los resultados. Definimos dos categorías de etapas de procesamiento de biochips para expresar la complejidad de estos biochips. Las etapas de procesamiento programadas son las acciones realizadas como resultado de programas automatizados, controlados por ordenador, que provocan una acción directa sobre una característica dentro o sobre el biochip e implican varios subsistemas del instrumento que interactúan con el biochip. Las acciones provocan un cambio en el estado físico de una característica en el biochip (por ejemplo, una membrana de una válvula se mueve para cerrar una válvula) o en una muestra o en el aire dentro del biochip (por ejemplo, se excita un colorante fluorescente en una muestra, se hace pasar aire a través de un accionamiento neumático). Además, la acción puede causar simultáneamente un cambio en el estado físico de una característica en el biochip y de una muestra dentro del biochip (por ejemplo, cuando las cámaras térmicas se calientan, la muestra dentro de ellas también se calienta).

Los subsistemas del instrumento realizan las acciones programadas e incluyen el subsistema neumático, que aplica presión para hacer estallar las láminas, aumenta y reduce la presión en las válvulas, y empuja líquidos, gases y sólidos; el subsistema de alta tensión, que aplica una corriente eléctrica a las macromoléculas electroforéticas; el subsistema óptico, que aplica luz para excitar y detectar una muestra en ensayos de electroforesis, cuantificación, amplificación, inmunoensayos y ensayos químicos; y el subsistema térmico, que aplica calor para la lisis celular, desnaturalización de ácido nucleico, uniformidad electroforética, termociclado y secuenciación cíclica. Es decir, cada etapa programada de procesamiento es una instrucción específica de un programa automatizado.

Las etapas programadas del proceso definen acciones directas que tienen lugar sobre características dentro o en el biochip a través de una interfaz con un subsistema del instrumento. Las características del biochip pueden ser microfluídicas, macrofluídicas, o una combinación de ambas, y el programa actúa sobre estas características en ubicaciones definidas en una secuencia definida. Por ejemplo, la activación de una válvula dada en el biochip se considera como una sola etapa programada del proceso, incluso si se requieren varios cambios en el instrumento como requisitos previos para efectuar esa sola etapa (por ejemplo, activar una bomba y una línea de conducción para permitir que la válvula se cierre).

Al cuantificar el número de etapas programadas del proceso, las etapas directamente repetitivas, tales como las de la amplificación por PCR (por ejemplo, muchos ciclos directamente repetitivos de desnaturalización, hibridación y extensión, cada uno de ellos caracterizado por un cambio de temperatura) se consideran como el número de etapas en un solo ciclo. Es decir, una reacción de amplificación por PCR que consiste en un arranque en caliente a 93 °C durante 20 segundos (1 etapa) seguido de 31 ciclos de [93 °C durante 4 segundos, 56 °C durante 15 segundos y 70 °C durante 7 segundos] (3 etapas) seguido de una extensión final de 70 °C durante 90 segundos (1 etapa), representa un total de 5 etapas programadas de procesamiento. Se puede actuar sobre una característica durante una o más etapas programadas del proceso. En este caso, cada acto independiente cuenta como una etapa; por ejemplo, si una válvula determinada se acciona siete veces durante un proceso, esto contaría como 7 etapas. Se puede actuar sobre varias características en paralelo durante el proceso de una muestra individual. Por ejemplo, si se accionan tres válvulas mientras se calienta una cámara del biochip, esto contaría como cuatro etapas programadas de procesamiento (en otras palabras, cuatro nuevas acciones realizadas sobre las características del biochip o dentro del mismo). Finalmente, una vez que se generan los datos en bruto del proceso, cualquier

procesamiento de datos (por ejemplo, corrección de color) o análisis de datos (por ejemplo, tipificación de alelos o de bases) no son etapas programadas de procesamiento. Los biochips de la presente invención realizan 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 400, 500, 750, 1000 y más de 1000 etapas programadas de procesamiento.

- 5 Las etapas de procesamiento resultantes son los efectos de las etapas programadas de procesamiento e incluyen el movimiento de la muestra líquida a lo largo del biochip a través de canales, cámaras y características de filtros y membranas; el secado de filtros y membranas, el termociclado de mezclas de reacción; la resuspensión de reactivos liofilizados, la unión de varios líquidos, la mezcla de líquidos, la homogeneización de líquidos, el transporte electroforético de macromoléculas de muestra a través de varias matrices, y la excitación de esas macromoléculas.
- 10 De ello se deduce que el número de etapas programadas de procesamiento será generalmente mayor (y nunca menor) que el de las etapas de procesamiento resultantes. Por ejemplo, puede ser necesario cerrar varias válvulas y cambiar varias presiones neumáticas de la línea conductora (múltiples etapas programadas de procesamiento) para provocar el movimiento de un tapón de fluido de un canal dado a una cámara adyacente (una sola etapa de procesamiento resultante). El Ejemplo 6 y la Figura 77 describen la relación entre etapas de procesamiento
- 15 programadas y resultantes para una parte de un programa automatizado. Los biochips de la presente invención realizan 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 125, 150, 175, 200, 250 y más de 250 etapas de proceso resultantes.

- 20 El total de etapas de procesamiento es la suma de las etapas programadas y resultantes del procesamiento. Cuanto mayor sea el número total de etapas de procesamiento, mayor será la complejidad del proceso. Los biochips de la presente invención realizan 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 400, 500, 750, 1000, 1500, 2000 y más de 2000 etapas de procesamiento totales. Las etapas de procesamiento programadas, resultantes y totales se refieren al procesamiento de una sola muestra. Si se procesan múltiples muestras en paralelo en un biochip dado, el número total de etapas de procesamiento es, por convención, el mismo que si solo se procesara una muestra. Similarmente,
- 25 si se procesan múltiples muestras idénticamente en serie (por ejemplo, si una primera muestra pasa a través del biochip y después la sigue una segunda muestra, sometiéndose al mismo proceso), el número total de etapas de procesamiento es el mismo que si se procesara una sola muestra. La importancia de estas diferencias es que la complejidad de los biochips de la invención se basa en la intrincada serie de manipulaciones de una sola muestra a diferencia de los biochips que realizan un número relativamente pequeño de etapas del proceso pero las repiten en
- 30 un número pequeño o grande de muestras.

- Los biochips de la invención permiten la integración de dos o más de las funciones mencionadas anteriormente. Por consiguiente, se puede diseñar un número ilimitado de combinaciones en el biochip, lo que permite completar un complejo conjunto de manipulaciones en el biochip. La complejidad del proceso implicará diversas manipulaciones
- 35 basadas en los elementos microfluídicos mencionados anteriormente. Por ejemplo, los biochips de la invención aceptan una muestra, potencian la mezcla de reactivos de lisis, lisan la muestra mediante burbujeo caótico, filtran el lisado, dosifican el lisado, unen el lisado a una membrana de sílice, lavan la membrana, eluyen los ácidos nucleicos de la membrana, homogeneizan el eluido para producir una disolución de ADN purificada, dosifican la disolución de ADN, reconstituyen una mezcla de reacción de PCR liofilizada para producir una reacción de PCR, mezclan y
- 40 homogeneizan la mezcla de reacción, dosifican la mezcla de reacción, realizan una amplificación multiplexada rápida, dosifican una parte de la reacción de PCR finalizada, reconstituyen un patrón de tamaño con la reacción de PCR medida para producir una disolución para la electroforesis, mezclan y homogeneizan la disolución, combinan la disolución con reactivos para la electroforesis, inyectan el material en un canal electroforético, realizan la separación electroforética, detectan los fragmentos de ADN separados basándose en la fluorescencia, generan un electroferograma basado en los datos de fluorescencia sin procesar, corrigen el color de los datos sin procesar,
- 45 identifican los picos de PCR en los datos procesados y analizan los picos observados (por ejemplo, para generar un perfil de STR para la identificación forense humana, generan un perfil multiplexado para diagnosticar una enfermedad infecciosa, o generan un perfil multiplexado para identificar un agente de amenaza biológica). Un experto en la materia apreciará que los biochips de la invención se pueden diseñar para realizar una multitud de
- 50 diferentes tipos de análisis con una complejidad de proceso esencialmente ilimitada.

VISIÓN GENERAL DEL DISEÑO DE BIOCHIPS

- Los biochips de la invención son unitarios y representan una sola estructura única. Estos biochips unitarios están
- 55 compuestos de muchas partes constituyentes, pero todas las partes, ya sean microfluídicas o macrofluídicas, están directa y permanentemente unidas, sin tener que usar tuberías para transportar líquidos, sólidos o gases de una parte a otra del biochip. Una ventaja de los biochips unitarios es que se pueden colocar en el instrumento correspondiente como una unidad, que no requiere que el operario tenga experiencia técnica en la parte. Además, la ausencia de tubos de conexión mejora la robustez minimizando filtraciones.

- 60 Preferentemente, los componentes principales de los biochips unitarios de la invención son plásticos. Las obleas de vidrio, cuarzo y silicio están ausentes o se minimizan en los biochips inventivos ya que son bastante costosas de fabricar. Se prefiere que todos los componentes (con la excepción de los elementos insertados, tales como reactivos, filtros, membranas, láminas metálicas, clavijas de electrodo y tiras de electrodo y materiales de
- 65 ensamblaje, tales como juntas, adhesivos y cintas sensibles a presión (ASP) estén hechos de plástico. También se prefiere que cada trayectoria de la muestra en el biochip sea de un solo uso; esto previene la contaminación entre

ejecuciones, simplifica el diseño y mejora la facilidad de uso. Por consiguiente, en un aspecto, la presente invención proporciona biochips de plástico desechables de un solo uso.

Los presentes inventores definen dos clases generales de biochips microfluídicos que se basan en los mecanismos de conducción usados para transferir disoluciones en su interior. Los biochips microfluídicos centrífugos tienen huellas circulares y giran para proporcionar fuerza centrífuga para conducir los fluidos de localización a localización dentro del biochip. Los biochips microfluídicos estacionarios (o no centrífugos) tienen una amplia gama de huellas (que incluye huellas rectangulares o sustancialmente rectangulares) y se caracterizan por conducciones que no se proporcionan por la rotación del biochip.

Los biochips de la presente invención son estacionarios, lo que significa que no requieren rotación para generar fuerza centrífuga para conducir fluidos a lo largo del biochip (aunque los biochips pueden estar sujetos a movimiento en general y movimiento de traslación en particular). En su lugar, los biochips de la invención tienen mecanismos de conducción que incluyen neumáticos, mecánicos, magnéticos y fluidicos. Se puede usar una variedad de métodos para el transporte de líquidos y el flujo controlado de líquidos. Un método es el bombeo de desplazamiento positivo, en el que un émbolo en contacto con el líquido o un gas que se interpone conduce el líquido a una distancia exacta basada en el volumen desplazado por el émbolo durante el movimiento. Un ejemplo de dicho método es una bomba de jeringa. Otro método es el uso de membranas elastoméricas integradas que se accionan neumáticamente, magnéticamente, o de otra manera. Un método preferido para conducir fluidos y controlar los caudales es usar una conducción neumática para aplicar vacío o presión directamente sobre los propios líquidos, alterando la presión en los meniscos delantero, trasero, o ambos, de los líquidos. Para lograr las características de flujo deseadas, se aplican presiones apropiadas (normalmente en el intervalo de 0,0035-20,7 bares (0,05-300 psig) y normalmente en el intervalo de 0,034-2,07 bares (0,5-30 psig). El flujo también se puede controlar seleccionando el tamaño apropiado de los canales fluidicos, ya que el caudal es proporcional al diferencial de presión a través del fluido y al diámetro hidráulico a la cuarta potencia e inversamente proporcional a la longitud del canal o del tapón de líquido y la viscosidad. Además, se puede controlar el flujo y alinear las muestras en paralelo incorporando membranas de ventilación a lo largo del canal de flujo.

Los biochips de la invención funcionan con un solo instrumento para llevar a cabo un análisis químico complejo. Los biochips inventivos descritos en el presente documento mejoran la eficiencia del procesamiento y la calidad de los datos eliminando la transferencia de muestras de instrumento a instrumento, mejorando la facilidad de uso minimizando o eliminando las exigencias del operario (una sola máquina puede, usando un programa y una interfaz de usuario apropiados, eliminar cualquier necesidad de acciones por parte del operario), mejorando la capacidad de reforzar el sistema (en un solo instrumento se pueden incorporar todos los subsistemas reforzadores) y reduciendo el coste de la instrumentación necesaria, así como la infraestructura de laboratorio necesaria para procesar las muestras. De hecho, en una realización, el tener la función de biochip en un solo instrumento puede obviar la necesidad de un entorno de laboratorio.

El instrumento proporciona todos los subsistemas necesarios para completar el procesamiento de muestras. Estos subsistemas incluyen subsistemas de energía de alta y baja tensión, subsistemas de termociclado, subsistemas neumáticos, subsistemas magnéticos, subsistemas mecánicos, subsistemas ultrasónicos, subsistemas ópticos, subsistemas reforzadores, subsistemas de control de procesos y subsistemas informáticos. La interfaz del instrumento con el biochip puede implicar uno o más de estos subsistemas, dependiendo de la conducción microfluídica y de la serie de procesos a realizar en el biochip. En el caso de los ejemplos de este documento, la interfaz de los biochips y del instrumento es neumática, eléctrica, óptica y mecánica. El tamaño del instrumento está determinado por las dimensiones del subsistema, las dimensiones del biochip y el rendimiento. Los instrumentos pueden pesar aproximadamente 4,53 kg (10 libras), 11,34 kg (25 libras), 22,67 kg (50 libras), 45,35 kg (100 libras), 68,03 kg (150 libras), 90,72 kg (200 libras) o más de 90,72 kg (200 libras). Similarmente, el volumen del instrumento puede ser de 0,5 pies cúbicos, o 1, 2, 4, 6, 10, 15, 20 o más de 20 pies cúbicos (es decir, peso: 4,5, 11,3, 22,7, 45,3, 68, 90,7 kg o más de 90,7 kg; volumen: 14, 28, 57, 113, 170, 283, 425, 566 l o más de 566 l).

Además, el biochip y la instrumentación de la invención están diseñados para poder funcionar fuera de entornos de laboratorio convencionales. Dependiendo de la aplicación, pueden reforzarse para soportar el transporte y los extremos de temperatura, la humedad y partículas en el aire. El uso de la invención por operarios no técnicos en consultorios, al aire libre, en campos de batalla, en aeropuertos, en fronteras y puertos, y en ambulatorios, permitirá una aplicación mucho más amplia de la tecnología genética en la sociedad. El uso de muestras no procesadas confirma además la amplia aplicación de las enseñanzas de la invención.

Los sistemas, instrumentos y biochips microfluídicos inventivos, expuestos en el presente documento, pueden ser de un solo uso o de uso múltiple. Las ventajas de los biochips desechables de un solo uso incluyen:

- **Minimización de la contaminación cruzada.** En un dispositivo de uso múltiple, la muestra, o un componente de la muestra, puede estar presente en el dispositivo después del lavado; el remanente puede contaminar un análisis posterior. Los dispositivos desechables de un solo uso están inherentemente libres de muestras remanentes. Esto es posible, en parte, por los novedosos canales de procesamiento de muestras y sus métodos de fabricación, en donde no hay comunicación de canales de muestra a muestra.

- *Minimización de los requisitos técnicos.* Un dispositivo de uso múltiple requiere un equipo para limpiar un dispositivo agotado y prepararlo para su posterior reutilización. Los desechables de un solo uso de la presente invención no están gravados por estos requisitos.

- *Minimización de los requisitos del operario.* Además de la experiencia necesaria para limpiar y preparar cuidadosamente un dispositivo agotado para su uso posterior, los reactivos se deben volver a cargar en un dispositivo multiuso, ya sea introduciéndolos en el dispositivo o en el instrumento. Al incorporar todos los reactivos en un dispositivo microfluídico desechable de un solo uso, el operario no necesita manipular ni estar expuesto a reactivos en absoluto. El operario solo necesita insertar la muestra en el dispositivo y pulsar un botón de inicio. De ello se deduce que los biochips inventivos descritos en el presente documento pueden ser manejados por operarios no especializados o mínimamente capacitados y se pueden realizar fuera del entorno típico de laboratorio. El análisis de muestras en el ambulatorio, el campo de batalla, puestos de control militar, embajadas, lugares críticos para la seguridad nacional y las regiones del mundo en desarrollo, es posible gracias a estos biochips inventivos. La recogida y el análisis autónomos de muestras que se aplican a aplicaciones, incluida la detección de amenaza biológica, también se benefician de una minimización de los requisitos del operario. En la solicitud de patente de EE. UU. N.º de serie 12/699.564, presentada el 3 de febrero de 2010, titulada "Nucleic Acid Purification", se describen trabajos que describen un enfoque que elimina esencialmente los requisitos de manipulación de muestras, simplificando y ampliando además las posibilidades de las metodologías analíticas.

- *Aumento del rendimiento del sistema.* La minimización de los requisitos técnicos y del operario permite un aumento del número de muestras analizadas por unidad de tiempo. El denso empaquetado de características permite procesar múltiples muestras en paralelo, y el uso de biochips grandes permite un mayor aumento en el rendimiento. Además, la inversión de la dirección del flujo del proceso (por ejemplo, la electroforesis frente a la purificación y la amplificación) permite un biochip y un instrumental más pequeños y compactos.

- *Minimización de costes.* La minimización de los requisitos de mano de obra y la eliminación de los gastos generales reducen los costes.

Los biochips de la invención descritos en el presente documento pueden tener dimensiones más grandes que las de una placa de microtitulación estándar de la SBS. Las dimensiones de la huella del biochip son de 86 por 128 o mayor, de 100 x 150 mm o mayor, de 115 x 275 mm o mayor, de 140 x 275 mm o mayor y de 165 x 295 o mayor. Además, los biochips inventivos incluyen huellas inferiores a 10.920,0 mm² que no cumplen las normas de la SBS. Las enseñanzas de la invención permiten el diseño y la fabricación de biochips con un grado de complejidad de número de muestra y complejidad de proceso sin precedentes. No hay límite para las posibles dimensiones de la huella del biochip. La huella puede fabricarse según las necesidades de un usuario particular y los requisitos de una aplicación dada.

A medida que aumenta el número de muestras y las complejidades del proceso de los biochips de la invención, aumenta la densidad característica de los biochips. En este contexto, las características microfluídicas se definen como cualquier área de la capa en cuestión que se corte mediante mecanizado por CNC o se moldee en torno a un molde por inyección. La densidad de las características es la relación entre el número de características microfluídicas y el área de la superficie de la capa en cuestión. Por ejemplo, los biochips de los Ejemplos 5 y 6 tienen las siguientes densidades: la parte superior e inferior de la capa fluidica tienen aproximadamente 20,2 % y 6,6 %, respectivamente, de sus áreas superficiales, ocupadas por características microfluídicas. La parte superior e inferior de la capa neumática tienen 7,5 % y 8,8 % de sus áreas superficiales ocupadas por características microfluídicas. La versión de 16 muestras del mismo biochip ocupa esencialmente la misma huella pero tiene densidades aún mayores: 19 % y 13,7 % para características fluidicas y un 18,3 % y 25 % para neumáticas. Las densidades locales en las capas pueden ser del 60 % o mayores (ciertas regiones de los biochips de los Ejemplos 4, 5 y 6 tienen densidades locales de más del 64 % en regiones de aproximadamente 3 cm². Los biochips neumáticos y fluidicos de la invención tienen 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80 y más del 80 % de sus áreas superficiales ocupadas por características microfluídicas. Las características macrofluídicas también contribuyen a la densidad.

CARACTERÍSTICAS DE LOS BIOCHIPS DE LA INVENCION

Los biochips de la invención comprenden capas termoplásticas que contienen características microfluídicas, tales como uno o más canales de transporte de fluidos (que pueden ser independientes, estar conectados o en red), orificios de paso, características de alineación, cámaras de almacenamiento de reactivos líquidos y liofilizados, cámaras de liberación de reactivos, bombas, cámaras de dosificación, cámaras de reconstitución de tortas liofilizadas, cámaras ultrasónicas, cámaras de unión y mezcla, elementos de mezcla, regiones de membrana, regiones de filtración, elementos de ventilación, elementos de calentamiento, elementos magnéticos, cámaras de reacción, cámaras de residuos, regiones de membrana, regiones de transferencia térmica, ánodos, cátodos y regiones de detección, líneas conductoras y de válvulas, estructuras de válvula, características de ensamblaje, regiones de interfaz del instrumento, ventanas ópticas, ventanas térmicas y regiones de detección. Los biochips también contienen características macrofluídicas, es decir, características que son versiones más grandes de los

5 mismos tipos que las características microfluídicas mencionadas anteriormente. Por ejemplo, el biochip contiene una cámara de almacenamiento de reactivo microfluídico que contiene 30 microlitros de líquido y una cámara de almacenamiento de reactivo macrofluídico que contiene cinco mililitros de líquido. La incorporación de características tanto microfluídicas como macrofluídicas en los biochips de la invención permite que un biochip dado cumpla tanto los requisitos de procesamiento tanto macrofluídicos como microfluídicos. Esto es una ventaja cuando muestras que requieren volúmenes relativamente grandes (tal como una muestra forense de hisopo o una muestra clínica de sanguínea) deben procesarse a escala microfluídica.

10 Los biochips también incorporan películas finas que incluyen películas finas estampadas, capas espaciadoras, capas adhesivas, capas elásticas y no elásticas, y regiones de detección. Los biochips también pueden incorporar capas con características basadas en mecanismos de conducción particulares (por ejemplo, líneas de activación para líneas conductoras neumáticas, mecánicas, magnéticas y fluidicas). Hay que tener en cuenta que los biochips microfluídicos también pueden contener regiones macrofluídicas, particularmente para el procesamiento de muestras forenses, de diagnóstico clínico y de amenaza biológica.

15 Los biochips de la invención permiten purificar, manipular y analizar ácidos nucleicos y otros componentes biológicos de muestras biológicas sin procesar. Las muestras biológicas sin procesar son las que son recogidas por un individuo y después se insertan en la cámara de recepción de muestras del biochip sin etapas de procesamiento intermedias (aunque el dispositivo de recogida de muestras puede marcarse y/o almacenarse antes del procesamiento). El operario solo tiene que recoger, o de otra manera, obtener la muestra, insertar la muestra en el aparato, insertar el aparato en el instrumento (no es necesario si el aparato se colocó previamente en el instrumento) y pulsar un botón de inicio. No es necesario procesar, manipular ni modificar la muestra antes de introducirla en el aparato - el operario no tiene que cortar un hisopo, abrir un tubo de sangre, recoger un tejido o un fluido biológico, transferir una muestra a otro soporte ni exponer la muestra a un reactivo o a una condición (por ejemplo calor, frío, vibración). Por consiguiente, no es necesario que el operario tenga una amplia formación en ciencias biológicas o técnicas de laboratorio. Opcionalmente, los biochips de la invención pueden aceptar muestras biológicas procesadas (por ejemplo, un lisado celular para su purificación posterior), aunque dichas aplicaciones pueden requerir un operario con formación técnica.

30 En la práctica, las muestras biológicas se recogen usando una miríada de dispositivos de recogida, todos los cuales se pueden usar con los biochips de la invención. Los dispositivos de recogida generalmente estarán disponibles en el comercio, pero también pueden diseñarse y fabricarse específicamente para una aplicación determinada. Para muestras clínicas, se dispone de una variedad de tipos de hisopos comerciales que incluyen hisopos nasales, nasofaríngeos, bucales, de fluido oral, de heces, de amígdalas, de vagina, de cuello uterino y de heridas. Las dimensiones y los materiales de los dispositivos de recogida de muestras varían, y los dispositivos pueden contener mangos especializados, tapas, ranuras para facilitar y dirigir la rotura, y matrices de recogida. Las muestras de sangre se recogen en una amplia variedad de tubos de diferentes volúmenes disponibles en el comercio, algunos de los cuales contienen aditivos (que incluyen anticoagulantes, tales como heparina, citrato y EDTA), un vacío para facilitar la entrada de la muestra, un tapón para facilitar la inserción de una aguja y recubrimientos para proteger al operario de la exposición a la muestra. También se recogen tejidos y fluidos corporales (por ejemplo, esputo, material purulento, aspirados), en tubos, generalmente distintos a los tubos de sangre. Estos dispositivos de recogida de muestras clínicas generalmente se envían a sofisticados laboratorios de hospitales o clínicos comerciales para su análisis (aunque determinados análisis, tales como la evaluación de hisopos de garganta/amígdalas para análisis estreptocócicos rápidos, se pueden realizar en el ambulatorio). Pueden estar presentes muestras ambientales, tales como filtros o cartuchos de filtro (por ejemplo, de respiradores de aire, aerosoles o dispositivos de filtración de agua), hisopos, polvos o fluidos.

50 Una técnica habitual de recogida de pruebas forenses se realiza usando un hisopo. Los hisopos están disponibles en el comercio de Bode (Lorton, VA), Puritan (Guilford, ME), Fitzco (Spring Park, MN), Boca (Coral Springs, FL), Copan (Murrieta, CA) y Starplex (Etobicoke, ON, Canadá). La toma de muestras con hisopo también se puede realizar usando materiales de tipo gasa, cepillos desechables o kits de muestreo biológico disponibles en el comercio. Las muestras forenses pueden contener sangre, semen, células epiteliales, orina, saliva, heces, varios tejidos y huesos. Las pruebas biológicas de un individuo que está presente en persona se suelen recoger usando hisopos bucales. Un hisopo bucal comercial muy utilizado es el SecurSwab (The Bode Technology Group, Lorton, VA). Las muestras bucales se recogen dando instrucciones al sujeto o al operario para que coloque el hisopo en la boca, en la superficie interior de la mejilla, y para que lo mueva hacia arriba y hacia abajo una o más veces.

60 Otra ventaja importante de los biochips de la invención es la capacidad de realizar procesos complejos en múltiples muestras en paralelo. Es importante tener en cuenta que la flexibilidad del biochip permite que se procesen múltiples muestras usando el mismo conjunto de manipulaciones o que cada muestra (o subconjunto de muestras) se procese usando un conjunto de manipulaciones a medida. Además, se pueden realizar varios análisis independientes en una muestra dada. Por ejemplo, una muestra forense podría analizarse aislando ADN y después realizando análisis de STR, análisis de SNP y secuenciación mitocondrial en el material purificado. Similarmente, una muestra clínica podría analizarse purificando ácidos nucleicos y proteínas y realizando PCR, PCR de transcripción inversa, secuenciación de ADN e inmunoensayos, lo que permite (por ejemplo) indagar sobre una muestra dada con respecto a una gran cantidad de organismos patógenos y a procesos celulares simultáneamente en un solo biochip.

Los presentes inventores describen en el presente documento numerosas soluciones a diferentes funcionalidades deseadas, así como soluciones a diferentes problemas de integración. Estas se proporcionan con fines ilustrativos y no limitativos, ya que un experto en la materia podrá adaptar estos componentes y técnicas de integración a una variedad de biochips e instrumentos para una variedad de usos.

Para el funcionamiento del biochip y el análisis de datos se requiere una serie de software y firmware. El hardware del instrumento está controlado por software y firmware que impone la función de los componentes y realiza la autocomprobación del instrumento. Un programa automatizado controla todas las interacciones del instrumento con el biochip, que incluye la aplicación de todas las etapas programadas del proceso. El software analítico realiza tanto el procesamiento de datos sin procesar (por ejemplo, corrección de color de un electroferograma) como el análisis de los resultados del ensayo (por ejemplo, tamaño de los fragmentos, tipificación de alelos de STR, análisis de la secuencia de ADN). El instrumento puede contener una interfaz gráfica de usuario que permite al usuario iniciar el proceso e informar al usuario del estado del proceso. Finalmente, el sistema puede almacenar comparadores analíticos pertinentes (por ejemplo, perfiles de STR de individuos de interés o secuencias de ADN de patógenos), o el sistema puede transportar los resultados para cotejarlos con bases de datos externas y análisis adicionales.

FABRICACIÓN DEL BIOCHIP

Se desvelan además métodos para la fabricación de biochips totalmente integrados, que no requieren preparación de muestras previas al proceso, que no están limitados por el intervalo de tamaño de la SBS y que pueden ser significativamente más grandes, que no están limitados a los formatos de microtitulación, que incorporan la complejidad del número de muestras y la complejidad del proceso.

Los biochips se pueden fabricar a partir de polímeros termoplásticos, que incluyen polietileno, polipropileno, policarbonato, poliestireno, poli(metacrilato de metilo) (PMMA), poli(tereftalato de etileno) (PET), polímero olefínico cíclico (COP) y copolímero olefínico cíclico (COC) y otros polímeros que son adecuados para la producción a gran escala según los novedosos métodos reivindicados en el presente documento. Los biochips se pueden fabricar mediante mecanizado por CNC de placas grandes (que incluyen aquellas que son más grandes que las placas estándar de la SBS), y las placas preforma para mecanizado por CNC se pueden moldear por inyección. Los biochips también se pueden fabricar mediante moldeo por inyección de placas grandes (que incluyen aquellas que son más grandes que las placas estándar de la SBS). Opcionalmente, los biochips se pueden recubrir (ya sea antes, en una etapa intermedia durante o después del ensamblaje) para mejorar el rendimiento. Se puede aplicar una amplia gama de recubrimientos y tratamientos. Por ejemplo, la exposición de canales a seroalbúmina bovina al 0,5 % reduce la unión de las proteínas presentes en la muestra a las paredes del canal. Para minimizar la formación de burbujas, se pueden aplicar productos hidrófobos, tales como PFC 502A (Cytonix, Beltsville MD) a canales, cámaras y válvulas. Similarmente, para proporcionar propiedades de sellado óptimas las membranas elastoméricas o no elastoméricas de las estructuras de válvulas neumáticas y mecánicas pueden recubrirse o tratarse de otro modo.

Otro aspecto más son los biochips y los métodos para fabricarlos que resuelven los problemas de fabricar biochips grandes para realizar series complejas de etapas de procesamiento en paralelo para permitir que se procesen múltiples muestras en el mismo biochip. Si el biochip se fabrica mediante mecanizado por CNC o moldeo por inyección, esta complejidad se consigue empaquetando densamente entre sí las delicadas características, en ciertas regiones del biochip, dejando espacio entre ellas para permitir la unión al mismo tiempo que se maximizan las relaciones de aspecto. Los biochips moldeados por inyección están diseñados y fabricados de manera que sean planos, sufran una deformación mínima, tengan características de contracción definidas durante la fabricación y la unión, y tengan tolerancias de alineación apropiadas para dar soporte a las características que permiten la complejidad de la etapa del proceso.

Los biochips pueden incluir varios subconjuntos que incluyen subconjuntos fluidicos, subconjuntos neumáticos, subconjuntos de válvulas, subconjuntos de procesamiento macrofluidico y subconjuntos de separación y detección. No todos los subconjuntos son necesarios para un biochip dado. Por ejemplo, si no se requieren volúmenes de muestra macrofluidica y reactivos en el chip, el subconjunto macrofluidico no es necesario. Sin embargo, los biochips de la invención tendrán generalmente al menos una capa mecanizada por CNC, en relieve, extruida o moldeada por inyección. Una sola capa contendría tanto características fluidicas como las características de control necesarias para transferir fluidos de una región del biochip a otra. En muchos casos, se prefiere una capa fluidica separada y una capa de control, lo que permite una mayor complejidad del proceso. La capa o capas pueden tener características en uno o ambos lados; las ventajas de las características de ambos lados es aumentar la complejidad del proceso, la densidad de las características y el número de muestras, disminuir el coste de fabricación y facilitar el ensamblaje. Cuando se utilizan múltiples capas, pueden unirse entre sí usando diversas técnicas conocidas en la materia, tales como unión térmica, unión con disolventes, unión adhesiva y soldadura ultrasónica (revisado en Tsao. C.-W. (2009). Bonding of thermoplastic polymer microfluidics. Microfluidics and Nanofluidics 6: 1-16). Al considerar el número de capas en un biochip microfluidico, es aconsejable utilizar el menor número de capas que permita obtener la complejidad deseada. Al minimizar el número de capas se reduce la complejidad de fabricación y ensamblaje y, en última instancia, el coste de fabricación del biochip.

Otro aspecto de la fabricación de los biochips de la invención se refiere a las capas ubicadas en la parte superior e inferior de los diversos subconjuntos. El propósito de estas capas intermedias, denominadas "películas finas", incluye unir entre sí las capas mecanizadas por CNC o moldeadas por inyección, sellar externamente las capas mecanizadas por CNC o moldeadas por inyección, proporcionar acoplamiento térmico entre el instrumento y las cámaras dentro de las capas, proporcionar características ópticas apropiadas para permitir la excitación y detección eficaces por componentes dentro del instrumento, proporcionar conductos entre capas, soportar las membranas, filtros y otros elementos, y proporcionar material para válvulas en tándem con las capas moldeadas por inyección. Los materiales no elastoméricos de las películas finas incluyen polietileno, polipropileno, policarbonato, poliestireno, polímero olefínico cíclico, copolímero olefínico cíclico, acrílicos, poli(tereftalato de etileno), aluminio y triacetato de celulosa. Los materiales elastoméricos de película fina incluyen una amplia gama de gomas (que incluyen la silicona) y elastómeros termoplásticos como se describe en *Plastics: Materials and Processing Third Edition* (ibídem). Estas películas pueden variar en espesor de 1 micra a 500 micras.

A medida que las capas mecanizadas por CNC o moldeadas por inyección y las películas finas se unen juntas para formar el biochip, la comunicación fluida entre y a través de las capas se proporciona mediante orificios de paso. Los orificios de paso son características que pasan de arriba a abajo de una capa dada para permitir que un líquido se desplace de una capa a otra. Los orificios de paso pueden tener esencialmente cualquier forma y son frecuentemente cilíndricos. Los biochips de la invención proporcionan grandes cantidades de orificios de paso para permitir la complejidad del número de muestras y la complejidad del proceso. Por ejemplo, los biochips de 6 muestras moldeados por inyección del Ejemplo 6 y sus homólogos de 16 muestras contienen los siguientes orificios de paso:

	<u>6 muestras</u>	<u>16 muestras</u>
Película neumática superior	117	346
Placa neumática	334	848
Película estampada rígida	131	346
Placa fluidica	299	1019
Película fluidica inferior	14	94
Película S&D inferior	34	94
Película de cubierta S&D	0	0

Hay que tener en cuenta que "S&D" se refiere a "separación e inyección". Tomadas en conjunto, estas partes del biochip de 6 muestras (exclusivas del subconjunto de procesamiento macrofluidico) contienen 929 orificios de paso y el conjunto de 16 muestras contiene 2747 orificios de paso. Los biochips de la invención contienen 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 2500 o más de 2000 orificios de paso. Cuando se consideran las características microfluidicas totales (que incluyen los orificios de paso), los biochips de la invención tienen 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 7500, 10000 o más características

Con una gran cantidad de características por capa, las capas de los biochips de la invención se deben alinear adecuadamente con todas las capas, así como con los diversos lugares de interfaz con el instrumento. Un factor en alineación se refiere a la contracción de las partes durante la unión, y particularmente durante la unión térmica; el problema de la alineación se ve agravado por la contracción diferencial de las piezas. Los biochips de la invención están diseñados y ensamblados para tener en cuenta la contracción diferencial. Para facilitar el ensamblaje, la parte con el mayor número de características se utiliza como patrón de contracción. Es decir, está diseñado de tal manera que, después de la unión, su tamaño es el necesario para la interfaz con el instrumento. Los tamaños de todas las otras partes se ajustan de manera que, después de la unión, se alinean con la placa estándar.

La alineación en los lugares de interfaz con el instrumento se logra dimensionando y colocando adecuadamente las características de la interfaz. Por ejemplo, las interfaces neumáticas de la invención consisten en varias docenas de puertos. En lugar de extenderse a lo largo de la capa neumática del biochip, están concentradas en el centro. Aunque la capa neumática se contrae en su conjunto, la región de interfaz neumática mucho más pequeña se contrae mucho menos. Además, los biochips tienen características de alineación para el ensamblaje, que incluyen orificios de alineación incorporados dentro de las capas fluidicas y neumáticas. Para alinear la capa fluidica con la neumática, en los orificios de alineación correspondientes de la capa neumática y las capas fluidicas se inserta un pasador guía. Las características de alineación para garantizar la colocación adecuada dentro del instrumento incluyen guías dentro del instrumento que se registran en la capa neumática (y no en la capa fluidica), donde se localizan las características del puerto neumático. Aunque se puede estimar la contracción de piezas, es prudente medir la contracción después del proceso de ensamblaje real. Por ejemplo, la placa neumática y la placa fluidica del Ejemplo 5 se contrajeron en (-0,063 %, 0,116 % en las direcciones X e Y, respectivamente) y (0,151 % y 0,401 %) respectivamente, y la placa neumática aumentó de tamaño en (0,214 %, 0,285 %) para compensar esta contracción diferencial.

Tanto la alineación entre capas como la alineación del biochip con el instrumento se gestionan minimizando el número de piezas a alinear. Por ejemplo, las placas neumáticas y fluidicas mecanizadas por CNC o moldeadas por inyección de los biochips de la invención tienen generalmente características que están presentes en ambos lados. Esto reduce a la mitad el número de piezas necesarias para el ensamblaje.

En conjunto con las características de alineación, las características de una capa dada que deben comunicarse con las de otra capa están diseñadas con tolerancias. En particular, las características de válvula (como se describe en el Ejemplo 2) requieren características neumáticas para alinearse con las cámaras fluidicas y los asientos de válvula. Además, los orificios de paso en la capa neumática conectan la salida de las cámaras dentro del subconjunto de procesamiento macrofluidico con los orificios de entrada correspondientes dentro de la capa fluidica. En general, cuando hay que alinear dos orificios de paso, uno de los orificios de paso debe tener un diámetro mayor de 0,5 mm para garantizar que se consiga la alineación de los dos orificios de paso.

Los biochips de la invención representan sistemas cerrados ya que las muestras se insertan y se sellan en el biochip y no salen líquidos del biochip (es decir, los reactivos del proceso que están contenidos dentro del biochip al inicio del procesamiento de la muestra están contenidos dentro del biochip al final del procesamiento de la muestra (y se retiran del instrumento cuando se retira el biochip). El aire de las líneas de conducción neumática entra en el biochip y el aire sale del biochip a través de las membranas de ventilación. Los biochips de sistema cerrado de la invención no exponen al operario a muestras ni a sustancias químicas, y característica importante de seguridad, y simplifican el instrumento ya que no es necesario almacenar los reactivos no usados ni gastados dentro del instrumento.

El moldeo por inyección de las características microfluidicas presenta muchos desafíos debido al gran número de características delicadas que deben estar presentes en un biochip complejo completamente integrado. Estas características microfluidicas están presentes algunas veces en una parte dada junto con características macrofluidicas, aumentando aún más los desafíos del moldeo por inyección. Los presentes inventores presentan en el presente documento soluciones específicas a consideraciones de diseño para tipos específicos de biochips, aunque, un experto en la materia será capaz de aplicar estas soluciones específicas para fabricar diversos tipos de biochips para funcionalidades específicas. Entre las consideraciones de diseño en estos ejemplos están: aspectos geométricos tales como contracción y estabilidad de forma en moldeo por inyección de precisión, aplanado de los biochips, deformación de los biochips, tamaños mínimos de características, densidad de características y relaciones de aspecto apropiadas. Las características de diseño de las piezas moldeadas por inyección de los biochips de la invención, se describirán en el contexto del proceso de moldeo por inyección. El moldeo por inyección es un proceso de fabricación de piezas de plástico en el que un molde se sujeta a presión para admitir el proceso de inyección de plástico fundido y de enfriamiento. Los gránulos de plástico (resinas granuladas) se alimentan en la máquina de moldeo por inyección, seguido de los colorantes apropiados. Las resinas caen en un barril de inyección, donde se calientan hasta un punto de fusión y se inyectan en el molde a través de un tornillo recíprocante o un dispositivo de apisonado. Los plásticos fundidos están contenidos dentro del molde, y se aplica presión hidráulica o mecánica para asegurarse de que se llenen todas las cavidades dentro del molde. Los plásticos se dejan enfriar en el molde, el molde se abre y la pieza de plástico se expulsa con pasadores de expulsión. Todo el proceso es cíclico, con tiempos de ciclo que varían de entre diez y 100 segundos, dependiendo del tiempo de enfriamiento requerido.

El molde consiste en dos componentes principales, el molde de inyección y el molde eyector. La resina plástica entra en el molde a través de una tobera en el molde de inyección; la tobera de inyección se sella herméticamente contra la boquilla del barril de inyección para permitir que el plástico fundido fluya desde el barril hacia el interior de cavidad del molde. La tobera de inyección dirige el plástico fundido a las imágenes de la cavidad a través de canales (o rieles) que se mecanizan en las caras de las placas. Los flujos de plástico fundido entran en una o más entradas y al interior de la geometría de la cavidad para formar la pieza deseada. El molde se diseña generalmente para que toda la pieza permanezca de manera fiable en el lado del eyector del molde cuando se abre. Después, la pieza cae libremente cuando se expulsa. Los moldes se pueden fabricar con una combinación de métodos de mecanizado que incluyen fresado CNC y mecanizado por descarga eléctrica.

El enfoque general para el diseño de los biochips inventivos para el moldeo por inyección incluye:

- Reducción del número de capas. El número de capas moldeadas por inyección se redujo a una capa fluidica y una capa neumática mediante la fabricación de características en ambos lados de las capas. Esto se consiguió en parte dirigiendo las líneas fluidicas y neumáticas de tal manera que los canales que se cruzan entre sí se dirigieron a lados distintos de las capas. En algunas ocasiones, se necesitaron transiciones hacia arriba y hacia abajo. Estas se minimizaron ya que las transiciones verticales conducen a grandes caídas de presión y reducción en la conductancia del canal. Se han diseñado características para permitir la soldadura ultrasónica de las membranas de ventilación y filtro. La incorporación de características soldadas permitió eliminar una capa moldeada por inyección.
- *Aumento en la densidad de características.* El aumento de la densidad de empaquetamiento de canales y características reduce el número y el tamaño de las capas moldeadas por inyección, lo que reduce la contracción y mejora a alineabilidad. En la región de colector neumático de la Figura 44, 61 de la capa neumática de los biochips del Ejemplo 5, por ejemplo, el paso de los canales es 1,0 mm, y 10 canales están localizados dentro de una región de 1 cm². Esta densidad se consiguió desarrollando un procedimiento de unión térmica que sellaba los canales a pesar de las estrechas paredes (0,5 mm) entre canales. La unión térmica de características con paso delicado y paredes estrechas se consigue usando accesorios de unión con superficies uniformes y baja rugosidad de la superficie para garantizar el aplanado. Además, se usaron dos platinas de unión y se fijaron para

que fueran paralelas con una tolerancia de 0,012 mm (0,0005") para garantizar una unión acorde con las características delicadas a través de un conjunto o subconjunto moldeado por inyección dado. Finalmente, la uniformidad de la temperatura a través de las platinas hasta dentro de 0,25 °C también garantiza una unión acorde a través del conjunto o subconjunto.

- *Minimización de los ángulos de inclinación.* Los lados verticales de todas las características se han doblado ligeramente con inclinación para facilitar la liberación de la pieza del molde. Los ángulos de inclinación en el moldeo por inyección varían generalmente del intervalo desde 2 - 7°. Las placas moldeadas por inyección de la invención usaban ángulos de inclinación incluso más pequeños de 0,5 %; cuanto más pequeño sea el ángulo de inclinación, más densamente empaquetadas estarán las características moldeadas por inyección. Para admitir estos pequeños ángulos de inclinación, se colocaron pasadores eyectores mucho más cerca de las características microfluídicas que lo habitual en un proceso de moldeo.
- *Orificios de paso.* El número de líneas de punto/soldadura se redujo colocando puertas apropiadas en el molde de inyección. Además, se minimizaron las grandes características abiertas en las piezas moldeadas, ya que es difícil mantener las dimensiones de las características y el flujo de resina alrededor de las grandes características.
- *Espesor de pared.* En todo el diseño se mantuvo un espesor de pared de 1,0 mm en los pisos de las características y de 0,5 mm entre las características.
- *Aplanado y deformación.* Para minimizar el espesor, se han adoptado espesores de capa y transiciones apropiados entre características. Para minimizar las tensiones internas de las piezas, el aplanado de la placa resultante se caracteriza y se realizan ajustes al proceso de moldeo por inyección. Las áreas de la placa moldeada que están deformadas se ajustan modificando la colocación de pasadores eyectores. Además, el mecanizado fino de las áreas irregulares mejora el aplanado.
- *Relación de aspecto de la característica.* Las características de alta relación de aspecto se han minimizado y las relaciones de aspecto se han mantenido por debajo de 2. Las características de relación de aspecto más altas tienden a impedir que las piezas moldeadas se expulsen efectivamente de la herramienta de moldeo.
- *Características de eyección.* Las ubicaciones de los pasadores eyectores se han minimizado y se han colocado solo en la mitad eyectora del molde. Los pasadores eyectores generan una deformación local en la superficie de la pieza que a su vez puede conducir a regiones que se unen mal o que nunca se unen. El recorrido de cada pasador eyector dentro del molde se ajustó para minimizar el desplazamiento necesario para la eyección repetible de la pieza.
- *Contracción de moldeo por inyección.* La contracción en el moldeo por inyección de la resina se caracterizó minuciosamente para admitir la contracción. Además, la contracción también se ajustó ajustando la temperatura de moldeo y los tiempos de espera. La contracción de las piezas neumática y fluidica se ajusta de tal manera que todas las características dentro de las placas moldeadas por inyección estén alineadas dentro de tolerancias definidas.
- *Moldeo en bloque.* Los enfoques descritos anteriormente son aplicables al moldeo de tanto placas planas (por ejemplo, la placa fluidica, placa neumática y placa de cubierta de procesamiento macrofluídico). Para moldear bloques de mayor volumen, tales como el bloque de procesamiento macrofluídico, estas estrategias se modifican ya que normalmente las relaciones de aspecto son mayores que 2. Para el moldeo en bloque, en el diseño se incorporan ángulos de inclinación menores de 1 °C y permiten retirar de manera eficaz el pasador de la pieza moldeada maximizando al mismo tiempo el volumen de las cámaras grandes.

Los biochips completamente integrados de la presente invención hacen realidad el potencial de la microfluídica, al proporcionar biochips que pueden llevar a cabo una serie compleja de etapas del proceso, desde la inserción de una muestra hasta la generación de un resultado, realizada en un solo instrumento sin intervención de operario. Asimismo, estos biochips de la invención pueden desecharse y fabricarse de manera rentable.

Ejemplos

Ejemplo 1. Almacenamiento y liberación de reactivos

Los biochips de la invención requieren reactivos para realizar diversos procesos, y estos reactivos deben ser compatibles con los materiales del biochip y con las condiciones de operación y ambientales a las que están expuestos.

Los reactivos de la invención se pueden introducir en el biochip de varias maneras. En primer lugar, los reactivos se pueden añadir al biochip manualmente, generalmente poco antes de uso. La ventaja de la adición manual es que no es necesario que el biochip contenga los reactivos durante largos períodos de tiempo, minimizando la necesidad de

una estabilidad a largo plazo en el biochip. Las desventajas de la carga manual son que el operario debe tener formación técnica y experiencia, los reactivos pueden colocarse incorrectamente impidiendo un procesamiento adecuado, y la colocación de reactivos puede ser una fuente de contaminación. Un segundo método de colocación es almacenando los reactivos en recipientes dentro o cerca del instrumento; los tubos u otros conductos que transferirán después los reactivos al biochip en el momento del proceso deseado. Una ventaja de este enfoque es que la colocación de los recipientes de reactivos una vez puede permitir múltiples ejecuciones analíticas del sistema. Las desventajas son la necesidad de conductos de transferencia sustanciales dentro del instrumento, el flujo comprometido a través de los conductos como, por ejemplo, cuando los reactivos residuales se secan en el conducto, la necesidad de abrir el instrumento, lo que permite el posible daño o contaminación, un aumento relativo del tamaño del instrumento para permitir el almacenamiento de reactivos para múltiples ejecuciones analíticas y la necesidad de un operario con formación técnica y experiencia.

Un enfoque preferido es almacenar los reactivos en el biochip, siendo los reactivos precargados una parte integral del biochip y esencialmente inaccesibles para el operario. La ventaja de este enfoque es que el operario nunca está en contacto con los reactivos ni se requiere formación técnica o experiencia, y, si el biochip es un sistema cerrado, se minimiza la posible contaminación. Además, el instrumento acepta el biochip pero no tiene que abrirse para colocar tubos o cartuchos de reactivos distintos. Cuando se combina con un sistema de conducción que garantiza que los reactivos en el chip no entren en contacto con el instrumento, el biochip es un sistema cerrado, mejorando aún más la facilidad de uso y minimizando la posibilidad de contaminación.

Para almacenar reactivos en el chip, estos deben ser compatibles con todos los materiales del biochip con los que se ponen en contacto y deben ser accesibles para el proceso cuando sea necesario. Se denomina enfoque a estos requisitos de "almacenamiento y liberación de reactivos (Reagent Storage and Release, RSR)", que indica que los reactivos se almacenan y confisan en el biochip y se liberan a demanda según sea necesario durante el procesamiento.

Los enfoques de RSR incluyen envases blíster, estructuras de tubo a tubo (en las que los tubos que contienen los reactivos se insertan en depósitos de reactivos del biochip), y estructuras de un solo tubo (en las que los reactivos se llenan directamente en los depósitos de reactivos del biochip). Los métodos de activación incluyen métodos basados en presión (que opcionalmente pueden implicar el uso de láminas ranuradas), métodos basados en alfileres (en los que alfileres accionados mecánica o neumáticamente perforan los sellos de lámina), y métodos mecánicos (en los que un componente del instrumento ejerce presión sobre el reactivo almacenado).

Envases blíster. En este enfoque, para almacenar los reactivos se usan blísteres sellados con papel de aluminio o envases de barra. Para liberar el contenido en el depósito de reactivos, se aplica fuerza mecánica a los envases.

Estructuras de tubo a tubo. En este enfoque, los tubos de reactivo se fabrican de un material termoplástico, y en la parte inferior del tubo, antes del llenado del reactivo, se aplica un sello de lámina y en la parte superior del tubo, después del llenado, se aplica un segundo sello de lámina. El tubo de reactivo sellado se inserta después en la cámara de reactivo apropiada del biochip. Para el termosellado, se dispone de una amplia selección de láminas de sellado de aluminio laminado. Estas láminas presentan una superficie polimérica de termosellado laminada en una película fina de aluminio. Los recubrimientos usados sobre la lámina de aluminio para la protección se seleccionan por su resistencia a los propios reactivos, al calor y al desgaste. El recubrimiento protector también puede servir como una superficie termosellada.

Estructuras de un solo tubo. En este enfoque, las cámaras dentro del propio biochip son los vehículos de almacenamiento. En este enfoque, la ventaja es que el biochip es relativamente más pequeño (ya que el de tubo en tubo requiere una pared adicional) y es más fácil de fabricar. La Figura 1 ilustra el enfoque RSR de un solo tubo. Los sellos de lámina (101) están unidos (mediante calor, mediante soldadura ultrasónica o mediante adhesivos) en la parte superior e inferior de cada cámara de almacenamiento de reactivo (102). Primero se une la lámina inferior, se rellenan los reactivos líquidos (indicado por el sombreado de 102), y después se une la lámina superior, sellando la cámara de almacenamiento de reactivo. Una cubierta superior (103) contiene líneas de conducción neumáticas que proporcionan la presión necesaria para que estallen las láminas. Entre las láminas también se pueden almacenar reactivos liofilizados (104).

La presión necesaria para hacer estallar las láminas superior e inferior hace que los reactivos fluyan rápidamente fuera de la cámara de reactivos. Para reducir el flujo de reactivo, en la parte inferior de las cámaras se fabrican orificios de control de flujo. El diámetro de los orificios está dimensionado para permitir el flujo deseado a las presiones de estallido de la lámina aplicada. También pueden utilizarse válvulas y membranas de ventilación para controlar el flujo de fluidos y los líquidos de la cola, como se describe en el Ejemplo 2. Además, cuando las cámaras RSR están sometidas a presión de accionamiento neumático, la lámina debe tener espacio suficiente para expandirse antes de estallar. Para admitir esta necesidad de espacio (aproximadamente 1 mm para una lámina de 25 micras de espesor y diámetro de 8 mm), se diseñó una placa espaciadora RSR para proporcionar un espacio de expansión para el estallido. La placa espaciadora RSR también proporciona la interfaz para acoplar las salidas de mayor diámetro (8 mm en este caso) de la cámara de reactivos y los orificios de entrada de menor diámetro (0,5 a 1 mm) del biochip, y hace la transición del flujo de reactivos entre las dos interfaces con conos. Los orificios de entrada

pueden ser orificios de paso en el subconjunto neumático que conducen a características en el subconjunto fluido, o pueden acoplarse directamente al subconjunto fluido o al subconjunto de separación y detección. La Figura 2 es una fotografía de la placa espaciadora 105 usada para un biochip de 5 muestras que muestra transiciones RSR 106 para acoplar las cámaras de reactivos líquidos que requieren estallido RSR. La transición convencional 107 acopla las cámaras de proceso utilizadas para mezclar y retener (pero no para almacenar reactivos, ya que no requieren espacio de expansión) con los orificios de entrada del biochip. La Figura 3 es una vista en sección transversal de una transición RSR 106 que está compuesta de una interfaz de cámara RSR 108, una sección estrechada cónica 109 y una interfaz de biochip 110. También se muestra una transición convencional 107 que es una transición de orificio de paso entre las cámaras de proceso y otro subconjunto del biochip. La placa espaciadora está fijada a las cámaras de reactivos y al adhesivo sensible a presión y fijadores mecánicos. Otras formas de fijación incluyen el uso de juntas con y sin adhesivos, tornillos, encastrado térmico y remaches.

El estallido neumático de láminas es el método preferido, ya que solo requiere neumática para su accionamiento. Los sellos de lámina estallan debido a la presión neumática que se suministra a la parte superior de los tubos a través de líneas de conducción neumáticas dentro del biochip. En esta configuración, la presión aplicada a la cámara de reactivo se impone sobre la lámina superior, haciendo que se rompa. Cuando se rompe, la presión se aplica directamente a los reactivos dentro del tubo. Esto a su vez hace que la lámina inferior se rompa y libere la disolución para el procesamiento. En la selección de láminas para el estallido neumático, deben tenerse en cuenta diversos factores. Para ser compatible con el estallido neumático, la presión de estallido debe ser apropiada para la estructura del biochip y tolerada por el biochip. Para los biochips de la presente invención, ensamblados mediante unión con calor, unión con disolventes y unión con adhesivos, la presión de estallido deseada es de aproximadamente 137,9 - 447 kPa (20 - 500 psig)*. Para este fin son apropiadas películas de lámina fina de 10 - 500 micras, preferentemente de 10 - 30 micras. *: 1,4 - 34,5 bares

La Figura 4 muestra presiones de estallido neumático necesarias para láminas de aluminio de 12 (línea continua) y 18 (línea discontinua) micras unidas a diámetros de cámara de 2 - 8 mm. La presión necesaria para el estallido aumenta al aumentar el espesor de la lámina y disminuye al aumentar el diámetro de la cámara/lámina. Cada punto muestra la presión promedio requerida para el estallido (para 2 mm de diámetro, n=2, para 3 mm de diámetro, n=6, para 4 mm de diámetro, n=10, para 5 mm de diámetro, n=9, para 6 mm de diámetro, n=10, para 7 mm de diámetro, n = 4 y para 8 mm de diámetro, n=4). La presión de estallido también puede verse afectada por el tipo de material de la lámina.

Opcionalmente, el ranurado de las láminas finas permite una reducción en la presión de estallido; en la lámina también se pueden utilizar ranuras de diversos tamaños y formas. Por ejemplo, se puede utilizar un láser o un troquel mecánico para ranurar líneas, cruces y círculos a profundidades variables para modular aún más la presión de estallido. La Figura 5 muestra una unidad RSR con seis cámaras (cada una con 8 mm de diámetro y 50 mm de altura). Una lámina de aluminio de 25 micras se sometió a ranurado con láser (líneas cruzadas de 4,5 mm colocadas en el centro de una profundidad de aproximadamente 10 micras) y se unió con calor a la unidad usando un encastrado térmico. La lámina inferior se colocó inicialmente, en cada cámara se llenaron los reactivos líquidos con colorante alimentario y la lámina superior se unió (Figura 6).

El estallido bilateral de las cámaras de reactivos se realizó llenando y sellando 2 ml de reactivos en las cámaras de la Figura 6. Las láminas usadas para el sellado de las cámaras se ranuraron (líneas cruzadas de 4,5 mm colocadas en el centro de una profundidad de aproximadamente 10 micras) para conseguir una presión de estallido nominal de 220,6 kPa (32 psig). Cada cámara estaba unida a una placa espaciadora RSR que a su vez estaba unida a un canal microfluídico. La salida del canal microfluídico se selló con una membrana de ventilación para permitir la salida de aire del estallido pero no para bloquear el fluido que se libera de las cámaras. En la parte superior de la cámara se fijó una cubierta. La cubierta acopla cada una de las 6 cámaras a una línea de conducción neumática. El sistema neumático se configuró para aplicar presión a la vez a una sola cámara. La presión de accionamiento neumático se aumentó gradualmente hasta que se observó que el líquido fluía hacia el canal microfluídico, y se registró esta presión. Las 24 láminas usadas en el ensayo (4 unidades RSR) estallan con una presión de 220,6 kPa $\pm$ 20,68 kPa (32 psig $\pm$ 3 psig)*. La Figura 7 muestra láminas después del estallido. Los materiales de la lámina, la profundidad y la configuración del ranurado, y las presiones de estallido se eligen en tandem para impedir que las piezas de la lámina se separen durante el estallido, posiblemente bloqueando los canales de salida de los reactivos. La lámina ranurada presentada en este documento no genera piezas de lámina distintas. *: 2,2 bares $\pm$ 0,2 bares

En un segundo experimento, las cámaras de reactivos se llenaron y sellaron con láminas ranuradas como antes. Las cámaras se unieron a una placa espaciadora RSR que estaba unida a un canal microfluídico. La salida de cada uno de los canales microfluídicos se selló con una membrana de ventilación. Se fijó una cubierta en la parte superior de la cámara y se aplicaron 310,3 kPa (45 psig)* de presión a todas las cámaras de reactivos simultáneamente durante 1 segundo. Todas las láminas se rompieron y se observó que el reactivo fluía en los canales microfluídicos y se detenía en la membrana de ventilación. El líquido dentro del canal estaba compuesto por un solo tapón sin burbujas. *: 3,1 bares

En su conjunto, estos experimentos demuestran el RSR, incluido el sellado de reactivos dentro de las cámaras, el estallido neumático de láminas de sellado, el control de la presión de estallido con diámetro de cámara y ranurado,

transición del reactivo a un canal microfluídico y colocación en la cola del reactivo con una membrana de ventilación.

Un enfoque relacionado con RSR utiliza presión mecánica en lugar de neumática para hacer estallar las láminas. En este método, se fabrican de plástico alfileres afilados en la parte superior e inferior de cada tubo de reactivo sellado con lámina (se pueden insertar alfileres metálicos para servir para el mismo propósito). Ambas láminas se perforan con alfileres, liberando los reactivos en el momento del proceso requerido.

Ejemplo 2. Control de flujo en biochips

Los biochips de la invención comprenden capas termoplásticas que contienen características delicadas, y se requiere el control del flujo de fluido para ejecutar el conjunto de etapas de procesamiento necesarias para generar los resultados analíticos. Las funciones fluídicas que requieren el uso de elementos de control de flujo incluyen:

- Dirigir los flujos de fluido de una característica a otra a través de canales en el biochip. El uso programado de líneas de conducción, válvulas y membranas de ventilación dirige el flujo de líquido y aire a través de canales y características específicos en el biochip. Por ejemplo, el filtro de purificación (Figura 39, 12) está conectado por canales fluídicos a las cámaras de reactivos y procesos. La secuencia de flujos de fluidos y válvulas que controlan el flujo dentro y fuera del filtro de purificación se describe mediante la etapa de unión a ADN, y las etapas de lavado, secado y elución del Ejemplo 5. En estas etapas, varias membranas de ventilación, válvulas (Figura 39, 46, 47, 43, 42 y 44) y líneas de conducción neumática se usan para dirigir flujos de fluido a través de esta cámara.
- Sellado de cámaras. Ciertas reacciones, tales como el termociclado y la secuenciación cíclica, requieren temperaturas elevadas. Un sellado de alta integridad es importante en dichos entornos debido a que la presión del fluido dentro de la cámara aumenta a medida que se calienta la reacción. Un mal sellado producirá filtraciones de fluido fuera de la cámara y permitirá que los gases de la reacción salgan y se generen burbujas. El sellado de las cámaras minimiza estos problemas y mejora la eficacia de la reacción. Por ejemplo, durante el proceso de termociclado, las cámaras de termociclado de los Ejemplos 5 y 6 se sellan por las válvulas V13 y V14 (Figura 40, 52 y 53).
- Mezcla recíproca. La mezcla recíproca es un enfoque de mezcla que se basa en forzar dos líquidos contra un balastro de aire y liberar la presión para permitir el flujo inverso. La aplicación repetida y la reducción de la presión aplicada consiguen la mezcla moviendo las disoluciones para mezclarlas "hacia adelante y hacia atrás". Este enfoque se ilustra en el biochip del Ejemplo 6, que usa una cámara de aire (Figura 70, 610) como un resorte que inicialmente es comprimido por el fluido por presión cuando el fluido es empujado contra él, y después empuja el fluido hacia atrás cuando se libera la presión. La cámara de aire se sella durante la mezcla recíproca por la válvula V13 (Figura 69, 52) donde se aplica una presión que aumenta linealmente de 0 a 103,4 kPa (0 a 15 psig) y después de 103,4 a 0 kPa (15 a 0 psig)*. Después de la mezcla, V13 se abre para permitir que las disoluciones mezcladas fluyan a través de las cámaras de PCR. *: 0 a 1,0 bar y después 1,0 a 0 bares
- Membranas de ventilación en la cola - Las variaciones en la velocidad de flujo de múltiples muestras que se procesan en paralelo en un biochip dado pueden ser el resultado de factores que incluyen diferencias en la viscosidad de la muestra (por ejemplo, contenido de ADN) y variaciones en la dimensión del canal (y, por lo tanto, en la conductancia). El uso de funciones en la cola acomoda variaciones en los flujos de fluido para múltiples muestras a través de canales paralelos dentro del biochip. En este enfoque, el tiempo máximo posible necesario para una etapa dada se usa como el tiempo de etapa. Las muestras que llegan primero a la membrana de ventilación se detendrán y esperarán mientras que las otras muestras con velocidades de flujo más lentas llegan al punto de la cola. Este enfoque proporciona tolerancia para procesar múltiples muestras simultáneamente garantizando que estén sincronizadas. La colocación en la cola de fluidos se pone en práctica en los Ejemplos 5 y 6 "Transferencia al interior de la cámara de termociclado" usando una membrana de ventilación (Figura 40, y Figura 69, 100) y una válvula (V29) (Figura 40 y Figura 69, 99) para detener la disolución de PCR de múltiples muestras en una posición común. Un enfoque alternativo, pero más complicado, para sincronizar múltiples muestras es controlar cada muestra por separado e incorporar características de detección (por ejemplo, óptica, térmica, química, mecánica) que permitan que el programa reciba retroalimentación cuando una muestra determinada llega a un punto determinado del biochip.
- Cámaras de dosificación - En múltiples casos, las disoluciones se dosifican a través del flujo del proceso. Un ejemplo de dosificación de los Ejemplos 5 y 6 es la etapa "Dosificación de eluido" que emplea una cámara de dosificación (Figura 40 y 70, 8), una válvula V12 (Figura 40 y 70, 51) y una membrana de ventilación VM (Figura 40 y 70, 100).
- Unión de disoluciones con tapones de aire entre ellas. Durante el procesamiento de la muestra, hay casos en los que se deben combinar dos tapones de fluido distintos de diferentes entradas y separados por aire. Un ejemplo de esto es la etapa de "unión del producto de PCR y formamida". En esta etapa se usa una cámara de unión (Figura 41 y 71, 78), membrana de ventilación y válvulas (Figura 41, elementos 100, 56, 81). La función de unión usa los elementos anteriores para recibir cada uno de los tapones de fluido en la cámara, eliminar aire entre los

fluidos y permitir que avance el tapón de fluido unido. En esta etapa, se usan válvulas para detener el flujo de líquido y aire. La membrana de ventilación se usa para ventilar el aire entre los tapones de fluido.

- 5 - Llenado de las cámaras de residuos. Las cámaras de residuos dentro del biochip están diseñadas para aceptar disoluciones en exceso, particularmente durante las etapas de dosificación. Un ejemplo de manipulación de residuos es la etapa de "dosificación de formamida". En esta etapa, una cámara de residuos (Figura 41 y 71, 77) consiste en una cámara que tiene una membrana de ventilación que sella toda la superficie superior y una válvula V15 (Figura 41 y 71, 54). El diseño de la válvula y de la cámara de residuos acomoda el exceso de fluidos que puede tener un volumen variable y puede contener burbujas de aire (y, por lo tanto, muestras que son tapones de fluido discontinuos). El uso de una cámara de residuos totalmente ventilada permite que se expulse el aire presente dentro de los tapones de fluido, y el uso de válvulas permite que el residuo se dirija a las cámaras y se sellen.
- 10 - División pasiva de muestras. El uso de una característica de conductancia diferencial pasiva para dividir los flujos de dos fluidos que están separados por aire en dos trayectorias puede ser ventajoso. En este diseño, una sola trayectoria de flujo se divide en dos trayectorias de flujo que terminan en cámaras ventiladas. La conductancia de flujo de un primer canal se reduce significativamente en relación con la de un segundo canal al incorporar una restricción de flujo pasivo a lo largo de su trayectoria fluidica. La restricción de flujo genera resistencia, y los líquidos que fluyen hacia la división fluirán en el canal de mayor conductancia hasta que la cámara ventilada se llene o la membrana de ventilación se humedezca por completo. Cuando cualquiera de esto ocurre, la restricción de este canal de flujo es alta y fluye líquido adicional hacia el segundo canal (a pesar del elemento de restricción de flujo). Este diseño se usa para controlar pasivamente el flujo de fluido entre dos trayectorias basándose en la conductancia. Esto es particularmente útil cuando dos líquidos en un canal están separados por un tapón de aire; el primer líquido fluye hacia la primera trayectoria y el segundo líquido se desvía hacia una segunda trayectoria.
- 15 - Ventilación de cámaras macrofluidicas. Las etapas de "burbujeo caótico" de los Ejemplos 5 y 6 dan como resultado una agitación significativa de un gran volumen de disolución. La disolución de lisis sobre el burbujeo caótico debe estar contenida dentro de la cámara para impedir que el reactivo salga del biochip y termine en el instrumento, mientras que grandes volúmenes de aire deben ser expulsados para permitir un flujo de aire adecuado que facilite el burbujeo. Esto se consigue usando una membrana de ventilación en la cubierta que actúa como una barrera para el flujo de fluido pero permite que se expulse aire de las burbujas caóticas. Para ventilar cualquier cámara sometida a burbujeo caótico o flujo de aire sustancial por cualquier motivo se utiliza un diseño similar.
- 20 - Aislamiento de las líneas de conducción - También se incorporan membranas de ventilación en la cubierta y en otras partes del biochip para aislar las líneas de conducción del instrumento de los fluidos dentro del biochip.

Estructuras de válvula

- 40 Las funciones anteriores se basan en dos estructuras de control de flujo: válvulas y membranas de ventilación. El biochip usa válvulas para el control de flujo para detener o permitir el flujo de fluidos dentro de los canales. Las válvulas pueden ser pasivas o activas, y las válvulas pasivas incluyen válvulas de gel polimerizado en línea, de tapón pasivo e hidrófobas. Las estructuras de las válvulas activas incluyen válvulas mecánicas (termoneumáticas y de aleación con memoria de forma), no mecánicas (hidrogel, sol-gel, parafina y hielo) y externas (modulares incorporadas, neumáticas y no neumáticas). Las estructuras de válvula neumática y mecánica también pueden hacer uso de membranas elastoméricas o no elastoméricas. En cualquier caso, las membranas se pueden tratar para proporcionar propiedades de sellado óptimas.

Se pueden utilizar muchos tipos de estructuras de válvulas en los biochips de la invención, y se pueden incorporar varios tipos en un biochip individual. La selección de una estructura de válvula se basa principalmente en la facilidad de fabricación y montaje en consonancia con el enfoque de la instrumentación. Por ejemplo, las válvulas mecánicas controladas por varillas que activan las características del biochip serían apropiadas en un instrumento con mecanismos de alineación y control mecánico sofisticados. Similarmente, las válvulas basadas en fusión localizada de cera requieren un instrumento con mecanismos de calentamiento especiales controlados. En los Ejemplos 5 y 6, el instrumento es capaz de un control neumático sofisticado, y los tipos de válvulas incorporadas (descritos más adelante) se basan en la activación neumática. En los biochips inventivos se pueden utilizar otros mecanismos de accionamiento neumático y no neumático (por ejemplo, mecánico, líquido, de cera, eléctrico) y las correspondientes válvulas.

- 60 En la Figura 8 se muestra la vista desde arriba de una estructura de válvula elastomérica accionada neumáticamente. La vista desde arriba muestra una cinta adhesiva sensible a presión (ASP) y una membrana elastomérica para la válvula normalmente abierta. En la Figura 9 se muestra una vista transversal de la válvula accionada neumáticamente para el control de fluidos y aire. Los componentes de la estructura de la válvula incluyen una membrana de válvula 202, asientos de válvula 203, cámara neumática 204, cámara fluidica 205, cinta ASP de doble cara 206, orificios de paso fluidico 208, canal fluidico 209 y canal neumático 210. Esta válvula se fabrica ensamblando 3 componentes:

Subconjunto fluídico. Este subconjunto contiene un canal para el flujo de fluido 209 (líquido o aire). El canal está interrumpido por un conjunto de orificios de paso 208 que pasan a través de la superficie. En la superficie, estos orificios de paso forman los asientos de válvula 203 del conjunto de válvula. Se fabrica mediante mecanizado por CNC de los canales y los orificios de paso en una lámina termoplástica (Figura 33) y cubriendo ambos lados con finas películas de plástico. En este caso, el plástico de película fina es una película termoplástica que se une. Las propias películas se han estampado mediante mecanizado por CNC, y tienen características que incluyen orificios de paso que están alineados con las características correspondientes en la capa mecanizada por CNC para proporcionar acceso a la capa fluídica de tipo sándwich. Similarmente, las mismas características dentro de las capas fluídicas y neumáticas también pueden fabricarse mediante moldeo por inyección.

Subconjunto neumático. Este subconjunto acopla el accionamiento neumático del instrumento al subconjunto fluídico para conducir neumáticamente los fluidos dentro del subconjunto fluídico y para activar neumáticamente las válvulas dentro del biochip. Los canales neumáticos 210 acoplan la conducción neumática a la cámara de la válvula. Este subconjunto se fabrica mediante mecanizado por CNC de un canal y cámaras en cada uno de los dos lados de una lámina termoplástica (Figura 44). Las características en las películas de plástico finas incluyen orificios de paso que están alineados con las características correspondientes en la capa mecanizada por CNC para proporcionar acceso a la capa neumática de tipo sándwich. La unión se realiza térmicamente pero también puede realizarse ultrasónicamente, con disolventes y usando adhesivos. Similarmente, las mismas características dentro de las capas fluídicas y neumáticas también se pueden fabricar mediante moldeo por inyección.

Subconjunto de válvula - Este subconjunto se sitúa entre el subconjunto neumático y el subconjunto fluídico. En esta construcción, el conjunto de válvula consiste en una membrana elastomérica 202 que tiene un espesor de 0,127 mm (0,005"). Cuando se activa neumáticamente, esta capa se desviará para controlar el flujo de fluidos (incluido el aire) dentro de la capa fluídica. Para fijar la membrana a la capa neumática superior, se usa una capa adhesiva sensible a presión 206 superior. Para fijar la capa de membrana 206 con la capa fluídica, se usa una capa adhesiva sensible a presión inferior. Las capas sensibles a presión están estampadas mediante corte con láser. La capa adhesiva sensible a presión también se puede estampar mediante métodos que incluyen troquelado o punzonado. La membrana elastomérica tiene un espesor de 0,127 mm - 0,381 mm (0,005" - 0,015") y el material puede ser de goma, tal como silicona.

La válvula se construyó ensamblando entre sí los tres subconjuntos. El conjunto fluídico y el conjunto neumático se unen mediante unión térmica. Similarmente, las placas neumáticas y fluídicas pueden sujetarse entre sí usando diversas sujeciones mecánicas, que incluyen tornillos, remaches, encastrado térmico y soldadura ultrasónica.

Estas válvulas están normalmente abiertas. Los fluidos fluirán a través del canal dentro de la capa fluídica, por el orificio de paso, en el cuerpo de la válvula, fuera del segundo orificio de paso y de vuelta al interior del canal dentro de la capa fluídica. Cuando se aplica presión al canal neumático, la presión desvía la membrana de válvula y empuja esta membrana contra los asientos de válvula y el piso de la cámara fluídica de válvula. Esto sella la trayectoria entre los orificios de paso y detiene el flujo a través de la válvula. La estructura de la válvula incorpora elementos de membrana y ASP que tienen altos grados de cumplimiento de manera que, en el conjunto, su compresión se acomoda a cualquier variación local en el aplanado de las dos partes que se están uniendo. Esta acomodación mejora la capacidad de formar sellos eficaces alrededor de las válvulas.

Se realizó un experimento para evaluar la presión de sellado de la válvula. Los canales neumáticos de la válvula se conectaron a una conducción neumática, VD. En una parte del canal fluídico que se acoplaba a la válvula, se cargó un volumen de líquido teñido (agua). La entrada al canal fluídico se conectó a otra conducción neumática FD. La presión de VD se estableció y se mantuvo constante durante el experimento. La presión de FD aumentó gradualmente hasta que se observó el flujo de fluido dentro del canal. La presión a la que el fluido comenzó a fluir es la presión de estallido de la válvula para una presión de sellado de válvula determinada. La presión de estallido de la válvula para presiones de sellado de válvula de 34,47, 103,4 y 151,7 kPa (5, 15 y 22 psig) fue de 20,68, 93,08 y 137,9 kPa (3, 13,5 y 20 psig), respectivamente. Estos datos muestran que para el sellado es aceptable una presión de sellado neumático superior a 13,79 kPa (2 psig) en comparación con la presión de conducción fluídica. En los biochips de los Ejemplos 5 y 6, en la mayor parte de las etapas del proceso, la presión de sellado de la válvula se establece a una presión habitual (151,7 kPa) (22 psig)*. Esto es eficaz para controlar múltiples válvulas simultáneamente y para controlar canales de flujo de hasta 124,1 kPa (18 psig)** de presión. Aunque en la mayoría de las funciones es adecuada una presión de conducción de válvula fija, un sistema variable permite aumentar la presión de la válvula (en los casos en que los requisitos de presión de conducción fluídica son altos) y reducirla (antes de abrir las válvulas) para minimizar cualquier agitación de los fluidos cuando se activa la membrana de la válvula. *: 1,5 bares; **: 1,1 bares

Cuando la válvula se usa durante las etapas del proceso de vacío y se extrae un fluido a través de la válvula, también se debe aplicar un vacío tanto a la línea fluídica como neumática para mantener la válvula en una posición abierta. Para cerrar esta válvula, se aplica presión como antes.

Aunque todas las válvulas en los biochips de los Ejemplos 4, 5 y 6 están en la configuración normalmente abierta, en este ejemplo, esas válvulas y los diversos tipos de válvulas se pueden diseñar en una configuración normalmente cerrada. Por ejemplo, la Figura 10 es una vista desde arriba de la cinta ASP y la válvula de membrana elastomérica para un funcionamiento normalmente cerrado. La Figura 11 una vista transversal de la cinta ASP y la válvula de membrana elastomérica para una configuración normalmente cerrada. La construcción de esta válvula es diferente de la de las Figuras 8 y 9 ya que los asientos de válvula están elevados de tal manera que están en contacto íntimo con la capa de membrana de válvula en el estado desactivado. Durante la fabricación y el ensamblaje, la membrana de válvula con los asientos de válvula en la fabricación se colocan bajo tensión. Para abrir la válvula, se aplica un vacío para alejar la membrana de válvula de los asientos de válvula. Hay que tener en cuenta que todas las válvulas en este ejemplo (excepto para la estructura de las Figuras 10 y 11) están normalmente abiertas. Para algunas aplicaciones, puede ser ventajoso incorporar válvulas de un solo uso, concretamente válvulas que no están diseñadas para abrirse y cerrarse repetidamente durante el proceso de ensayo, sino que, por ejemplo, comienzan el proceso en un estado abierto y se cierran una vez durante el proceso de ensayo.

La Figura 12 muestra la vista desde arriba de una válvula accionada neumáticamente con una membrana de válvula rígida con configuración normalmente abierta. En la Figura 13 se muestra una vista transversal de la válvula accionada neumáticamente con una membrana de válvula rígida para el control de fluidos y aire. Los componentes de la estructura de la válvula incluyen una membrana de válvula 202, asientos de válvula 203, cámara neumática 204, cámara fluidica 205, orificios de paso fluidico 208, canal fluidico 209 y canal neumático 210. Esta válvula se fabrica ensamblando 3 componentes:

Subconjunto fluidico. Este subconjunto contiene un canal para el flujo de fluido (líquido o aire). El canal está interrumpido por un conjunto de orificios de paso 208 que pasan a través de la superficie. Estos orificios de paso forman los asientos de válvula 203 del conjunto de válvula. Como alternativa, el canal puede dirigirse a lo largo del lado superior de la placa fluidica e interrumpirse a medida que pasa a través de la válvula. Los extremos del canal forman los asientos de válvula de este conjunto. Este conjunto se fabrica moldeando por inyección los canales y los orificios de paso en un termoplástico. En este caso, la membrana 202 de la válvula es una película termoplástica de película fina que está unida. La cámara fluidica 205 de esta estructura está conformada a la forma de la membrana rígida bajo una deflexión total para efectuar el sellado.

Subconjunto neumático. Este subconjunto acopla el accionamiento neumático del instrumento al subconjunto fluidico para conducir neumáticamente los fluidos dentro del subconjunto fluidico y para activar neumáticamente las válvulas dentro del biochip. El canal neumático acopla la conducción neumática con la cámara de la válvula. Este subconjunto se fabrica mediante moldeo por inyección de las características de canal y de cámara en termoplástico (Figura 72 y 73). Las características en las películas de plástico finas incluyen orificios de paso que están alineados con las características correspondientes en la capa moldeada por inyección para proporcionar acceso al subconjunto neumático. La unión se realiza térmicamente, pero también puede realizarse ultrasónicamente, con disolventes y usando adhesivos.

Subconjunto de válvula. Este subconjunto se ubica entre el subconjunto neumático y el subconjunto fluidico. En esta construcción, el conjunto de válvula consiste en una fina película termoplástica. La película puede tener un espesor entre 10 y 250 micras. En el Ejemplo 6, se usaron películas de termoplástico de 40 micras, 50 micras y 100 micras. Cuando se activa neumáticamente, esta capa se desvía para controlar el flujo de fluidos (incluido el aire) dentro de la capa fluidica. La válvula se construyó ensamblando entre sí los tres subconjuntos. El conjunto fluidico y el conjunto neumático se unieron entre sí térmicamente o por disolventes. Alternativamente, también se puede usar un adhesivo de doble cara para adherir entre sí los conjuntos superior e inferior. La fina membrana termoplástica y rígida de la válvula es parte integral de la capa fluidica, una ventaja significativa durante el ensamblaje del biochip.

Estas válvulas están normalmente abiertas. Los fluidos fluyen a través del canal dentro de la capa fluidica, por el orificio de paso, en el cuerpo de la válvula, fuera del segundo orificio de paso y de vuelta al interior del canal dentro de la capa fluidica. Cuando se aplica presión al canal neumático, la presión desvía la membrana de la válvula rígida y empuja esta membrana contra los asientos de válvula y el piso de la cámara fluidica de válvula para sellar la trayectoria entre los orificios de paso y detiene el flujo a través de la válvula.

Para evaluar la presión de sellado de la válvula, se realizó un experimento fabricando una válvula usando los métodos anteriores con una membrana de 100 micras. Los canales neumáticos de la válvula se conectaron a una conducción neumática VD. En una parte del canal fluidico acoplado a la válvula, se cargó un volumen de líquido teñido (agua). La entrada al canal fluidico se conectó a otra conducción neumática FD. La presión de FD se estableció y se mantuvo constante durante el experimento. La presión de VD disminuyó gradualmente desde un nivel alto de 551,6 kPa (80 psig*) hasta que se observó que el fluido fluía dentro del canal. La presión de sellado de la válvula necesaria para mantener una FD de 6,89, 13,79, 20,68, 27,58 y 34,47 kPa (1, 2, 3, 4 y 5 psig) fue de 100,7, 193,1, 372,3, 451,6, 561,9 kPa (14,6, 28, 54, 65,5 y 81,5 psig)** respectivamente. La membrana rígida usada en esta construcción de válvula requiere la aplicación de una presión más alta para sellar los flujos de fluido. La reducción del espesor de la membrana de la válvula de 100 micras a 50 micras y 40 micras redujo sustancialmente los requisitos de presión para sellar contra los flujos de fluido. Para la operación de vacío en la que los fluidos se extraen a través de los canales, se aplica un vacío a la válvula para mantenerla en una posición abierta. *: 5,5 bares;

** : 0,07, 0,14, 0,21, 0,28 y 0,34 bares eran 1,0, 1,93, 3,72, 4,52 y 5,62

La Figura 14 muestra una vista desde arriba de una válvula de membrana elastomérica, normalmente abierta y con abrazadera. La vista transversal de esta válvula accionada neumáticamente para el control de fluidos y aire se muestra en la Figura 15. Los componentes de la estructura de la válvula incluyen una membrana de válvula 202, asientos de válvula 203, cámara neumática 204, cámara fluidica 205, orificios de paso fluidico 208, canal fluidico 209, canal neumático 210 y anillos de compresión 212. Esta válvula se fabrica ensamblando 3 subconjuntos. Una ventaja de esta estructura es que es muy sencilla y no requiere cinta ASP.

Subconjunto fluidico - Este subconjunto contiene un canal para el flujo de fluido 209 (líquido o aire). El canal está interrumpido por un conjunto de orificios de paso 208 que pasan a través de la superficie. En la superficie, estos orificios de paso forman los asientos de válvula 203 para el conjunto de válvula. Se fabrica mediante mecanizado por CNC de los canales y los orificios de paso en una lámina termoplástica (Figura 33) y cubriendo ambos lados con finas películas de plástico (Figura 36 y Figura 37). En este caso, la película fina de plástico es una película termoplástica unida. Las propias películas se han estampado mediante mecanizado por CNC, y tienen características que incluyen orificios de paso que están alineados con las características correspondientes en la capa mecanizada por CNC para proporcionar acceso a la capa fluidica de tipo sándwich. Similarmente, las mismas características dentro de las capas fluidicas y neumáticas también se pueden fabricar mediante moldeo por inyección. Alrededor de la cámara fluidica 212 se forma un conjunto de anillos de compresión con membrana de válvula.

Subconjunto neumático - Este subconjunto acopla la conducción neumática del instrumento con el subconjunto fluidico para conducir neumáticamente los fluidos dentro del subconjunto fluidico y para activar neumáticamente las válvulas dentro del biochip. Los canales neumáticos 210 acoplan la conducción neumática con la cámara de la válvula. Este subconjunto se fabrica mediante mecanizado por CNC de un canal y cámaras en cada uno de los dos lados de una lámina termoplástica (Figura 12). Las características en las películas de plástico finas incluyen orificios de paso que están alineados con las características correspondientes en la capa mecanizada por CNC para proporcionar acceso a la capa neumática de tipo sándwich. La unión se realiza térmicamente, pero también se puede realizar ultrasónicamente, con disolventes y usando adhesivos. Similarmente, las mismas características dentro de las capas fluidicas y neumáticas también se pueden fabricar mediante moldeo por inyección. Alrededor de la cámara neumática 211 se forma un conjunto de anillos de compresión con membrana de válvula. Los anillos de compresión de las cámaras fluidica y neumática coinciden entre sí y se alinearán entre sí.

Subconjunto de válvula - Este subconjunto se ubica entre el subconjunto neumático y el subconjunto fluidico. En esta construcción, el conjunto de válvula consiste en una membrana de silicona 202 que tiene un espesor que es 0,127 mm (0,005"). Cuando se activa neumáticamente, esta capa se desviará para controlar el flujo de fluidos (incluido el aire) dentro de la capa fluidica.

La válvula se construye ensamblando entre sí los tres subconjuntos. El conjunto fluidico y el conjunto neumático se unen mediante unión térmica. Similarmente, las placas neumáticas y fluidicas pueden sujetarse entre sí usando diversas sujeciones mecánicas, incluidos tornillos, remaches, encastrado térmico y soldadura ultrasónica. Las capas neumática y fluidica están unidas de manera que la capa de membrana entre los anillos de compresión (212) se comprime. El grado de compresión variará del 5 % al 60 % y es una función del durómetro y el espesor de la membrana de la válvula. El grado de compresión es suficiente cuando el accionamiento neumático está sellado dentro de la cámara neumática y los fluidos no se escapan de las cámaras fluidicas.

Estructuras de ventilación

El componente microfluidico del aparato usa membranas de ventilación para ventilar el aire y servir como barrera para los flujos de fluido. Las membranas de ventilación que se usaron en los biochips de los Ejemplos 5 y 6 se seleccionaron en función de la tensión superficial del líquido que se transportaba y la energía libre de la superficie. Cuando existe una diferencia significativa entre las dos, el ángulo de contacto entre la superficie sólida y el líquido es alto y las gotitas de líquido serán repelidas desde la superficie de la membrana y no ensuciarán la membrana. Otra consideración es el caudal de aire a través de la membrana. Este debe ser lo suficientemente alto como para permitir una ventilación de aire sin restricciones. Normalmente, para un material dado, la diferencia entre la energía libre de superficie y la tensión superficial aumenta con la disminución del tamaño de los poros; sin embargo, el caudal de aire es inversamente proporcional al tamaño del puerto. Por ejemplo, la tensión superficial del agua es 0,00073 N/cm (73 dinas/cm), la del alcohol isopropílico 0,00022 N/cm (22 dinas/cm) y la del aceite 0,0003 N/cm (30 dinas/cm).

Las membranas de ventilación usadas en el biochip incluyen las que están fabricadas de: politetrafluoroetileno (PTFE), un material muy usado en ventilación médica y filtración de gases. Es un material inerte que ofrece excelentes propiedades de flujo y alta resistencia a productos químicos. La inestabilidad dimensional de formas cortadas de este tipo de membrana puede causar dificultades en el manejo robótico en operaciones de sobremoldeo. El PTFE es incompatible con la esterilización con rayos gamma o E debido a que la escisión de la cadena causa pérdida de integridad cuando el material está expuesto a radiación ionizante; el poli(fluoruro de

vinilideno) (PVDF) es un material duradero que ofrece buenas propiedades de flujo y una gran resistencia a productos químicos. Está disponible en formas tanto naturales como superhidrófobas; el polietileno de peso molecular ultra-alto (UPE) es una entrada más reciente en el comercio de ventilación médica y filtración de gases. Es un material naturalmente hidrófobo que ofrece excelentes propiedades de flujo y gran resistencia a productos químicos; la membrana acrílica modificada tratada para ser hidrófoba es una opción económica para aplicaciones de ventilación. Es oleófobo, hidrófobo y químicamente compatible.

La Figura 16 muestra una vista transversal de una configuración de membrana de ventilación usada en los biochips del Ejemplo 5. La membrana de ventilación (Figura 16, 213) se incorpora a la estructura colocando la membrana entre las capas neumática y fluidica y mediante unión térmica. La Figura 17 muestra una vista transversal de una configuración de membrana de ventilación (Figura 17, 213) que se usó en los biochips del Ejemplo 6. En esta configuración de membrana de ventilación, la membrana de ventilación está soldada a la capa fluidica con una arista de soldadura.

Ejemplo 3. Interfaz del Biochip

Los biochips de la invención interactúan con un instrumento. El instrumento proporciona todos los subsistemas necesarios para completar los análisis de muestras, incluidos los subsistemas de energía de alta y baja tensión, subsistemas de termociclado, subsistemas neumáticos, subsistemas magnéticos, subsistemas mecánicos, subsistemas ópticos, subsistemas reforzadores, subsistemas de control de procesos y subsistemas informáticos, como se muestra en la Figura 58. La interfaz del instrumento con el biochip incluirá uno o más de estos subsistemas, dependiendo de la conducción microfluidica y de la serie de procesos a realizar en el biochip. En el caso de los ejemplos del presente documento, la interfaz del biochip y del instrumento es neumática, eléctrica, óptica y mecánica, y es la siguiente:

Interfaz del subsistema neumático.

El subsistema neumático está acoplado al biochip a través de un colector neumático. La Figura 18 muestra el área del colector neumático para el biochip del Ejemplo 5 y consiste en una serie de puertos neumáticos que se ubican en el lado superior de la placa neumática. Se incorporan cinco tipos de puertos con la interfaz neumática:

Conducciones de flujo bajo. Los puertos de flujo bajo se usan para suministrar activación neumática de válvulas y conducción de fluidos a través del biochip.

Conducciones de flujo alto. Los puertos de flujo alto se usan para suministrar aire necesario para procesos tales como agitación por burbujeo y secado de la membrana de purificación, que requieren flujos de hasta 19 SLPM. Los tamaños de los puertos se agrandan para minimizar las caídas de presión.

Conducción de alta presión. Este puerto se utiliza para suministrar hasta 2.758 kPa (400 psig)* necesarios para el llenado de la matriz de tamizado. *: 27,6 bares

Puertos de condensado. El condensado generado por las bombas mecánicas dentro del instrumento se puede conducir opcionalmente a una cámara del biochip a través de la interfaz neumática.

Puertos de ensayo del instrumento. Se pueden incorporar puertos de ensayo en el colector neumático para ensayar el sistema neumático del instrumento y confirmar la alineación del colector neumático del instrumento con la del biochip.

Los puertos neumáticos se sitúan en una matriz, con 34 puertos de flujo bajo y 7 puertos de flujo alto. La ubicación de este colector neumático se seleccionó basándose, en parte, en las siguientes consideraciones:

Minimización del área de la superficie del lugar de la interfaz. Cuanto más compacta sea la región de interfaz neumática, menor será la contracción y la deformación local durante el moldeo por inyección interferirá con la interfaz, permitiendo una mejor alineación.

Recogida de todos los puertos neumáticos en un único lugar de interfaz. Este enfoque se adoptó para simplificar el instrumento, una ventaja en un sistema que se reforzará y se utilizará fuera del laboratorio. Normalmente, la única interfaz se ubicará en el centro dentro de la huella del biochip, pero también puede estar ubicada en un extremo del biochip. Alternativamente, se podrían distribuir múltiples interfaces a través del biochip. En los biochips de los Ejemplos 5 y 6, los puertos neumáticos están en el centro en una ubicación para permitir un punto de acoplamiento compacto entre el instrumento y el biochip. Esta organización y colocación del colector simplifica el direccionamiento de las líneas neumáticas dentro del biochip en comparación con tener puertos descentralizados o tener todos los puertos ubicados en un extremo del biochip. Esto también aumenta la tolerancia de la alineación entre el colector y los puertos neumáticos y simplifica el direccionamiento de los tubos neumáticos dentro del instrumento.

Ubicación de los puertos en el biochip basándose en la densidad de características - Hay áreas en las placas
 5 fluidicas y neumáticas donde la densidad de características es baja. Es óptimo ubicar el colector neumático en estas
 áreas cuando sea posible. En general, el uso óptimo del espacio en el biochip (es decir, el empaquetado lógico de
 todas las características microfluidicas y macrofluidicas) es importante para maximizar la densidad de características
 y la complejidad de los procesos de un biochip de dimensiones dadas. En los biochips de los Ejemplos 5 y 6, los
 puertos neumáticos se ubican en el lado superior de la capa neumática. Similarmente, los puertos neumáticos
 también pueden ubicarse en el lado inferior de la capa fluidica y acoplarse al instrumento a través del soporte del
 chip. La ubicación absoluta de los puertos está determinada por la densidad de las características, la utilidad
 10 funcional y facilidad de diseño. En los biochips de los Ejemplos 5 y 6, las regiones de termociclado se ubican en el
 lado inferior del subconjunto fluidico, requieren presión de sujeción desde arriba para establecer un contacto térmico
 eficaz con el termociclador. Por consiguiente, los puertos neumáticos centralizados se ubican en el lado superior del
 subconjunto neumático de tal manera que un solo mecanismo de sujeción podría funcionar para interaccionar
 simultáneamente con el biochip térmica y neumáticamente.

15 Sistema cerrado - Como se indicó anteriormente, los biochips de la invención son sistemas cerrados de manera que
 todos los líquidos están ubicados dentro del biochip durante y después del procesamiento. Las membranas de
 ventilación (como se describe en el Ejemplo 2) se usan para bloquear el flujo de fluido involuntariamente desde el
 biochip al colector neumático del instrumento.

20 Como una ilustración del flujo neumático y el colector neumático, se presentará el enfoque de conducción de fluidos
 dentro del subsistema de procesamiento macrofluidico de la "etapa de lisis" del Ejemplo 5. Para efectuar este etapa,
 la línea de conducción DL1 de lisis (Figura 39, 68) se activó para conducir la disolución de lisis desde la cámara de
 reactivos de lisis (Figura 39, 20) al interior de la cámara de hisopo (Figura 39, 19). El controlador de proceso activó
 el relé solenoide del instrumento que aplicó la presión deseada en el puerto de la línea de conducción DL1 de la
 25 interfaz neumática (Figura 39, 20). El aire es conducido a través de la interfaz neumática en el puerto DL1 (Figura
 18, 301) del colector neumático, a lo largo del canal neumático de la placa neumática (Figura 18, 302) hasta el
 puerto de interfaz microfluidico dentro de la placa neumática (Figura 19, 303). Este puerto de interfaz conduce la
 presión de la línea neumática a través de los canales neumáticos dentro del bloque de procesamiento macrofluidico
 (Figura 47, 26) y al interior de la cubierta del subconjunto de procesamiento macrofluidico (Figura 48, 27). La
 30 cubierta, a su vez, dirigió la conducción neumática a lo largo de un canal (Figura 48 y 53, 304) hacia la cámara de
 reactivos de lisis (Figura 47, 20). Tomadas en conjunto, la etapa resultante es la transferencia del reactivo de lisis
 desde la cámara de reactivos de lisis a través del subconjunto de fluidos, y finalmente, a la cámara de hisopo (Figura
 20, 20).

35 Similarmente, si los reactivos dentro de la cámara están sellados mediante láminas, como en el Ejemplo 1, entonces
 la conducción neumática se aplica en una acción de dos etapas, donde la primera etapa es generar un pulso para
 hacer estallar la lámina, y la segunda etapa es similar a la ilustración anterior que no es RSR.

Interfaz del subsistema de alta tensión

40 El subsistema de alta tensión está acoplado al biochip a través de un conjunto de clavijas de electrodo y un arnés de
 cables. Alternativamente, también se puede fabricar un conjunto de electrodos metálicos finos grabados. En esta
 configuración, las clavijas de los electrodos se introducen en el ánodo y los cátodos mediante ajuste por presión en
 el biochip. Las clavijas de los electrodos hacen contacto con tiras de electrodos ubicadas en la parte superior del
 45 subconjunto neumático y también se insertan mediante ajuste por presión. Esta tira de electrodos está acoplada al
 instrumento por un conjunto de electrodos con resorte en el instrumento. Las tiras de electrodos están fabricadas de
 cobre berilio (BeCu), un metal de alto rendimiento que puede fabricarse en una gran variedad de componentes. Sus
 propiedades mecánicas y eléctricas lo convierten en el material ideal para productos de blindaje EMI/RFI. La tira de
 electrodos también se puede fabricar de otros metales.

Interfaz del subsistema óptico

50 Como se describe en las solicitudes de patente N.º de serie 12/396.110, publicada como 2009/00229983 titulada
 "Ruggedized Apparatus for Analysis of Nucleic Acid and Proteins", y 12/080.745, publicada como 2009/0020427
 55 titulada "Plastic Microfluidic Separation and Detection Platforms", el láser está acoplado a la ventana de separación y
 detección de la pila neumática-válvula-fluidica (Ejemplos 5 y 6) a través de una abertura en el soporte del chip. Para
 permitir la búsqueda de carriles de los carriles dentro del biochip de separación y detección, se usa un conjunto de
 fotodiodos.

Interfaz del subsistema térmico

60 El termociclador y el biochip se sitúan de tal manera que las cámaras de termociclado están en el centro dentro de
 los elementos TEC, como se describe en la solicitud N.º de serie 12/080.746, publicada como 2009/0023603 titulada
 "Methods for Rapid Multiplexed Amplification of Target Nucleic Acids". Se requiere una fuerza de sujeción de 40,8 kg
 65 (90 libras) para conseguir un buen contacto entre las cámaras de termociclado y el TEC para generar con precisión
 los perfiles de ciclado de temperatura. La presión de sujeción es generada por el brazo de sujeción y la compresión

de una almohadilla de silicona. El brazo de sujeción ejerce la presión necesaria para empujar hacia abajo la almohadilla de silicona.

Se realizó un experimento para evaluar la fuerza de sujeción necesaria para una transferencia térmica eficaz. Se usó un cilindro activado neumáticamente (Figura 21, 305) para ejercer una fuerza controlada sobre un biochip de PCR (Figura 21, 401). A cada nivel de fuerza, la PCR se realizó siguiendo protocolos estándar (Véase, Giese, H., et al. (2009). "Fast multiplexed polymerase chain reaction for conventional and microfluidic short tandem repeat analysis". J Forensic Sci 54(6): 1287-96, y se analizaron los perfiles de STR. Los datos mostraron que a una fuerza inferior a 34 kg (75 libras), se generaban perfiles de STR incongruentes. Cuando se aplicaron fuerzas superiores a 34 kg (75 libras), se observó una amplificación congruente y eficaz (Figura 22).

El subsistema de separación y detección está acoplado a los calefactores del soporte del chip para mantener una temperatura de 50 °C. La uniformidad de la temperatura es importante y la fijación del biochip en las placas calefactoras contribuye al establecimiento y mantenimiento de la uniformidad de la temperatura.

Alineación mecánica

Para alinear todas las interfaces del biochip con el instrumento, el biochip se coloca en el soporte del chip del instrumento que contiene un conjunto de guías de alineación mecánica. Estas guías proporcionan la alineación de las características de la interfaz del biochip con el instrumento a dentro de $\pm 0,508$ mm (0,020"). Las guías registran el chip en tres ubicaciones a lo largo del borde de la placa neumática, cerca de las esquinas para ubicar el origen y la orientación. En esta configuración, las guías tienen un interruptor para ubicarse solo frente a la capa neumática (esto minimiza cualquier efecto de ligeras desalineaciones entre las capas de la placa fluidica y neumática).

Ejemplo 4. Biochip mecanizado por CNC que acepta y mezcla ADN y reactivos de PCR y realiza simultáneamente una reacción de amplificación de 16-plex en 17 minutos de dieciséis muestras.

El biochip de PCR 401 de la Figura 23 se moldeó por inyección en un formato de portaobjetos y se examinó satisfactoriamente para una PCR multiplexada rápida. Este biochip tiene un espesor de 25 mm x 75 mm x 1,1 mm. El sistema permite la amplificación multiplexada en fragmentos de STR a partir de un solo genoma equivalente de ADN humano (6 pg de ADN, esencialmente un límite de detección de una sola copia) como se describe en Giese, H. et al. (2009). "Fast multiplexed polymerase chain reaction for conventional and microfluidic short tandem repeat analysis". J Forensic Sci 54(6): 1287-96.

Basándose en ese resultado, se diseñó y fabricó un biochip (huella de 76,2 mm x 127 mm) mediante mecanizado por CNC. La capa fluidica 1 (Figura 24, 403) y la capa fluidica 2 (Figura 25, 404), la capa neumática 1 (Figura 26, 405) y la capa neumática 2 (Figura 27, 406) se fabricaron mediante mecanizado por CNC a partir de una lámina termoplástica. El subconjunto fluidico (Figura 28, 407) se fabricó ensamblando la capa fluidica 1 (Figura 24, 403), la capa fluidica 2 (Figura 25, 404) y una película termoplástica fina no estampada y con unión mediante calor. El subconjunto neumático (Figura 29, 408) se fabricó mediante unión térmica de la capa neumática 1 (Figura 26, 405) y la capa neumática 2 (Figura 27, 406). El ensamblaje del biochip (Figura 30, 409) se fabricó uniendo el subconjunto fluidico (Figura 28, 407) con el subconjunto neumático (Figura 30, 409) e incorporando un subconjunto de válvula elastomérica, normalmente abierta, como se describe en el Ejemplo 2.

Para examinar el biochip, se prepararon 160 microlitros de mezcla maestra de reactivos de PCR, suficiente para 16 muestras de amplificación y se insertaron en el depósito de reactivos de mezcla maestra (Figura 28, 410) del biochip mecanizado por CNC. En cada uno de los pocillos de muestra (Figura 28, 411), se insertó 9,3 microlitros de ADN (molde total de 1 ng). El biochip se conectó al instrumento de ciclado neumático/termociclado (Figura 31). Se ejecutó un programa automatizado con las siguientes etapas:

- *Inicialización.* Todas las válvulas se cerraron.
- *Muestra y reactivo en cola.* El reactivo de PCR se condujo neumáticamente en las cámaras de dosificación de PCR del biochip (Figura 28, 412) aplicando 6,89 kPa (1 psig) a la línea de conducción DR (Figura 28, 419). Se dosificó un volumen de 9 microlitros de mezcla maestra. La muestra para cada carril se puso en la cola en una membrana de ventilación aplicando 6,89 kPa (1 psig) a la línea de conducción DS (Figura 28, 418).
- *Eliminar el exceso de reactivo de PCR.* El exceso de mezcla maestra de PCR se eliminó de los canales de distribución haciéndolos fluir al interior de la cámara de residuos de reactivo (Figura 28, 414) abriendo la válvula WV (Figura 28, 413) y aplicando 6,89 kPa (1 psig) a la línea de conducción DR (Figura 28, 419). La cámara de residuos de reactivo (Figura 28, 414) se selló cerrando la válvula WV (Figura 28, 413) y la línea de conducción DR (Figuras 28, 419) se desactivó.
- *Desplazamiento del reactivo a la cámara de unión (JC).* La mezcla maestra de PCR se condujo neumáticamente al interior de la cámara de unión (Figura 28, 415) abriendo las válvulas RV (Figura 28, 416) y aplicando una presión de conducción neumática de 6,89 kPa (1 psig) durante 30 segundos. Las válvulas de

reactivo RV (Figura 28, 416) se cerraron y la DR se desactivó (Figura 28, 418).

- *Desplazamiento de la muestra al interior de la cámara de unión (JC).* La muestra se condujo neumáticamente al interior de la cámara de unión (Figura 28, 415) abriendo las válvulas SV (Figura 28, 415) y aplicando una presión de conducción neumática de 6,89 kPa (1 psig) durante 30 segundos a la DS (Figura 28, 419). La muestra y la mezcla maestra de PCR se unieron en la cámara de unión para formar la disolución de PCR. La válvula SV (Figura 4, 6, 415) se cerró y la línea de conducción DS (Figura 4, 6, 419) se desactivó.
- *Desplazamiento de la disolución de PCR al interior de la cámara de mezcla (MC).* La disolución de PCR se introdujo en la cámara de mezcla (Figura 28, 421) abriendo la válvula JCV (Figura 28, 420) y RV (Figura 28, 416) y aplicando una presión de 6,89 kPa (1 psig) durante 30 segundos a la DR (Figura 28, 418).
- *Mezcla de la muestra y el reactivo.* La mezcla recíproca se realizó conduciendo la disolución de PCR al interior de una cámara de aire AC (Figura 28, 422) abriendo las válvulas RV (Figura 28, 416; la válvula JCV ya estaba abierta) y *aplicando* una presión de conducción a la DR (Figura 28, 418) que aumenta linealmente desde 0 - 103,4 kPa (0 - 15 psig) y después desde 103,4 - 0 MPa (15 a 0 psig)* (durante 30 segundos). Esto se repitió 2 veces. Las válvulas JCV (Figura 28, 420) y RV (Figura 28, 416) se cerraron y la DR (Figura 28, 418) se desactivó. *: 0-1,0 bares y después desde 1,0-0 bares
- *Desplazamiento de la disolución de PCR al interior de las cámaras de PCR (PC).* La disolución de PCR se desplazó al interior de la cámara de PCR (Figura 28, 423) abriendo las válvulas PV1 (Figura 28, 424), PV2 (Figura 28, 425), JCV (Figura 28, 420) y RV (Figura 28, 416) y aplicando una presión de 3,44 kPa (0,5 psig) durante 30 segundos a la línea de conducción DR (Figura 28, 418). Las válvulas PV1 (Figura 28, 424), PV2 (Figura 28, 425), JCV (Figura 28, 420) y RV (Figura 28, 416) se cerraron.
- *Termociclado.* Las válvulas PV1 (Figura 28, 424) y PV2 (Figura 28, 425) se cerraron, y el termociclado se realizó con un protocolo de 28 ciclos que requirió 17 minutos.
- *Recuperación del producto de PCR.* Las válvulas OV1 (Figura 4, 6, 426), PV1 (Figura 28, 424), PV2 (Figura 28, 425), JCV (Figura 28, 420) y RV (Figura 28, 416) se abrieron. Para recuperar manualmente el producto de PCR del puerto OP (Figura 29, 427) se usó la punta de una pipeta. Los productos de PCR se recuperaron de las 16 muestras del biochip.

Resultados. Después de ejecutar el programa, la reacción de PCR se retiró de cada canal y se separó y se detectó en el instrumento Genebench. En la Figura 32 se muestra un perfil de STR representativo de la reacción.

Ejemplo 5 Mecanizado por CNC de un biochip completamente integrado que purifica ácidos nucleicos, amplifica el ADN purificado, separa electroforéticamente el ADN amplificado y genera un perfil de STR usando un programa automatizado.

Un biochip de plástico, unitario y estacionario, que acepta 5 hisopos bucales y que genera perfiles de STR, consiste en las siguientes partes:

Subconjunto fluídico - Este subconjunto transfiere y procesa fluidos dentro del biochip, interaccionando con el subconjunto neumático, subconjunto de procesamiento macrofluídico, subconjunto de válvulas y subconjunto de separación y detección. La placa fluídica del subconjunto fluídico se fabricó mediante mecanizado por CNC de un conjunto interconectado de canales y cámaras en los lados superior e inferior de una hoja de COP. La placa fluídica tiene unas dimensiones de 276 mm x 117 mm x 2,5 mm. La Figura 33 muestra el lado superior de la placa fluídica 1, la Figura 34 muestra el lado inferior de la placa fluídica 1 y la Figura 35 muestra una vista transparente de la placa fluídica 1, mostrando las características de ambos lados. La placa fluídica mecanizada por CNC se fabricó mecanizando una preforma moldeada por inyección con un espesor de 2,5 mm. Los lados superior e inferior de la placa están cubiertos con películas de plástico finas estampadas. La Figura 36 muestra la película fina estampada superior 2 y la Figura 37 muestra la película fina estampada inferior 3; las películas finas tienen un espesor de 100 micras. Una ventaja de tener características que estén presentes tanto en la parte superior como en la parte inferior de la placa fluídica es que solo se requiere una placa fluídica para el conjunto (de lo contrario se requerirían dos placas). En general, minimizar el número de placas en un conjunto es una gran ventaja ya que hace que la alineación de las piezas sea más directa y fiable, minimiza los efectos de deformación y contracción diferenciales, y por lo tanto, permite un conjunto más eficaz a un coste reducido.

Los canales en este biochip se pueden caracterizar de la siguiente manera: 1) Canales de procesamiento de muestras. Cada hisopo bucal a analizar corresponde a un conjunto único de canales que realizan la purificación de ADN, la amplificación por PCR, la separación y detección, y todas las etapas del proceso necesarias para realizar estas manipulaciones de ácido nucleico. El conjunto único de canales para cada muestra no se comunica con los conjuntos de canales de otras muestras. Es decir, los canales no se comunican de muestra a muestra y no comparten cámaras (que no sean una cámara de ánodo), regiones de filtro, o regiones de membrana relacionadas con otras muestras, conservando así la pureza de cada muestra y evitando la mezcla accidental de muestras o la

contaminación cruzada. Determinadas líneas de conducción neumática se dividen para conducir múltiples muestras en paralelo, pero la conducción se realiza neumáticamente, conservando la integridad de cada muestra. Asimismo, el conjunto único de canales para cada muestra es una trayectoria cerrada; solo el aire de las líneas conductoras neumáticas entra en el biochip, y solo el aire a través de las membranas de ventilación sale del biochip, los reactivos líquidos son proporcionados por el biochip y los líquidos no salen del biochip. La Figura 38 muestra la trayectoria 4 que toma una sola muestra a través de la placa fluidica. La Figura 39 muestra una vista ampliada de esta trayectoria 4 a través de la región de purificación 5, la Figura 40 muestra una vista ampliada de esta trayectoria 4 a través de la región de amplificación 6, y la Figura 41 muestra una vista ampliada de esta trayectoria 4 tomada a través de la región de separación y detección 7. Es importante tener en cuenta que la dirección de la electroforesis es opuesta a la de la purificación y la amplificación. Este cambio de dirección se ve facilitado por orificios de paso en la capa fluidica que pasan la muestra a la capa de separación y detección justo por debajo. 2) Canales de procesamiento de gel. Estos canales se utilizan para llenar el subconjunto de separación y detección con matriz de tamizado y tampón en preparación para la separación y detección. Es decir, los canales se llenan desde depósitos de reactivos comunes. Después de finalizar la purificación, la amplificación y la pre-electroforesis, cada canal de separación recibe una muestra única a través de cátodos específicos de muestra. Cada muestra tiene una única cámara de cátodo y un canal de separación, y todas las muestras comparten una sola cámara de ánodo a través de la cual se cargan los reactivos de electroforesis.

La placa fluidica contiene una región de filtro de partículas, una región de membrana de purificación y varios tipos de cámaras, incluyendo cámaras de dosificación, cámaras de reconstitución, cámaras de mezcla, cámaras de unión, cámaras de residuos y cámaras de cátodos y ánodos. Estas cámaras y regiones están en línea con los canales y tienen formas y dimensiones determinadas por la funcionalidad requerida. Por ejemplo, una cámara de dosificación de reactivos (Figura 40, 8) se caracteriza por dimensiones y volúmenes diferentes a los de una cámara de cátodo (Figura 41, 9) o una cámara de reconstitución (Figura 40, 10).

Los canales, las cámaras y las regiones de filtro y membrana están cubiertos, en este caso a través de la unión de películas termoplásticas finas (placas mecanizadas por CNC o moldeadas por inyección, también pueden formar las cubiertas). El sándwich de película fina - capa fluidica - película fina se le denomina "subconjunto fluidico".

Las propias películas se han estampado mediante mecanizado por CNC, y las películas finas de la invención también se pueden estampar mediante diversos procesos que incluyen troquelado o punzonado y corte con láser. Estas películas finas tienen características que incluyen orificios de paso que están alineados con las características correspondientes en la capa fluidica mecanizada por CNC para proporcionar acceso a las características de la capa fluidica. Por ejemplo, la muestra pasa desde la capa fluidica a través de los orificios de paso en la película fina estampada inferior hasta el subconjunto de separación y detección. Antes de unir a la placa las películas finas superior e inferior, también se incorporan componentes adicionales para funciones que incluyen la filtración de partículas (Figura 39, 11), la purificación de ADN (Figura 39, 12) y la ventilación (Figura 41, 13). La unión de las películas finas estampadas con la placa fluidica se realizó térmicamente, pero también se puede realizar ultrasónicamente, con disolventes y usando adhesivos. Para facilitar el método de unión se pueden añadir características a la placa y a las películas; por ejemplo, se pueden colocar aristas conductoras de energía en los lugares de soldadura ultrasónica.

Subconjunto neumático - Este subconjunto acopla la conducción neumática del instrumento (como se describe en el Ejemplo 3) con el subconjunto fluidico, subconjunto de procesamiento macrofluidico, subconjunto de válvulas y subconjunto de separación y detección para conducir neumáticamente fluidos y activar válvulas dentro del biochip. Este subconjunto se fabrica mediante mecanizado por CNC de una serie de líneas de conducción neumática interconectadas en cada uno de los dos lados de una hoja de COP. Algunas de las líneas de conducción son específicas de la muestra y otras están relacionadas con funciones inespecíficas de la muestra, tales como el llenado de gel. La Figura 42 muestra el lado superior de la placa neumática 14, la Figura 43 muestra el lado inferior de la placa neumática 14 y la Figura 44 muestra una vista transparente de la placa neumática 14, mostrando las características de ambos lados. La placa neumática tiene dimensiones de 276,7 mm x 117,3 mm x 2,50 mm. La placa neumática mecanizada por CNC se fabricó mecanizando una preforma moldeada por inyección con un espesor de 2,5 mm. El lado superior de la placa neumática está cubierto con una película de plástico fina estampada 15 (Figura 45). El lado inferior de la placa neumática está cubierto con una película fina intacta 16, y ciertas regiones de esta película se cortan después de la unión (Figura 46) para permitir el acceso a la placa desde el subconjunto de la válvula. Las películas finas tanto estampadas como no estampadas tienen un espesor de 100 micras. Los patrones se pueden cortar antes de la unión (como en el caso de la película neumática superior) o después de la unión (como es el caso con la película neumática inferior). La razón por la cual se seleccionó una etapa de estampado posterior a la unión fue porque las grandes regiones de corte se eliminaron fácilmente después de la unión. La unión de las películas finas con la placa neumática se realizó térmicamente, pero también se puede realizar ultrasónicamente, con disolventes y usando adhesivos. Para facilitar el método de unión se pueden añadir características a la placa y a las películas; por ejemplo, en los lugares de soldadura ultrasónica se pueden colocar aristas conductoras de energía. Finalmente, la placa neumática también puede tener características fluidicas y viceversa. Esto puede ser útil si, por ejemplo, la placa fluidica está saturada de características y la placa neumática tiene espacio disponible. En este caso, la placa neumática se seguirá denominando placa neumática debido a su posición en el biochip general y al hecho de que la mayoría de sus características eran neumáticas.

Independientemente de su ubicación, las líneas y canales neumáticos solo contienen aire. Por otro lado, las características fluidicas pueden contener líquidos y aire.

Las características en las películas de plástico finas incluyen orificios de paso que están alineados con las características correspondientes en la capa neumática mecanizada por CNC para proporcionar acceso directo a la capa neumática o acceso indirecto a la capa fluidica a través de la capa neumática. Por ejemplo, los reactivos en las cámaras del subconjunto de procesamiento macrofluidico pasan a través de los orificios de paso del subconjunto neumático (películas finas y placa neumática) en su camino hacia el subconjunto fluidico. La unión de las películas finas estampadas con la placa neumática se realizó térmicamente, pero también se puede realizar ultrasónicamente, con disolventes, mediante sujeción y usando adhesivos.

Subconjunto de válvula - Este subconjunto se ubica entre el subconjunto neumático y el subconjunto fluidico. Consiste en un material elastomérico, que, cuando se activa neumáticamente, se deformará, deteniendo así el flujo de fluidos (incluido el aire) dentro de la capa fluidica. Este subconjunto consiste en una película elastomérica que puede desviarse, aunque se puede incorporar cualquiera de los conjuntos de válvula descritos en el Ejemplo 2.

Pila neumática-válvula-fluidica - Este subconjunto se fabrica ensamblando el subconjunto neumático, el subconjunto de válvulas y el subconjunto fluidico, y uniéndolos térmicamente entre sí la pila. Las membranas de ventilación (Figura 44, 17) se incorporan en este subconjunto colocándolas sobre las características de ventilación del subconjunto fluidico (Figura 35, 13) y las características correspondientes en el subconjunto neumático. La membrana de ventilación está en la forma de una sola tira que se usa para cubrir las características de ventilación de múltiples muestras simultáneamente. Para cubrir muchas áreas de ventilación, se aplica una tira de membrana de ventilación. En general, la reducción del número de piezas permite facilitar el montaje, ya sea manual o automatizado. La unión de los dos subconjuntos también se puede realizar térmicamente, ultrasónicamente, con disolventes, mediante sujeción y usando adhesivos. Para facilitar el método de unión se pueden añadir características a la placa y a las películas; por ejemplo, en los lugares de soldadura ultrasónica se pueden colocar aristas conductoras de energía o se puede usar una capa de unión adicional para facilitar la unión térmica.

Subconjunto de procesamiento macrofluidico - Este subconjunto consiste en dos elementos principales: un bloque macrofluidico y una cubierta. Este subconjunto acepta muestras, proporciona reactivos al biochip y sirve como interfaz entre los volúmenes y procesos microfluidicos y macrofluidicos, como se describe adicionalmente en la solicitud N.º de serie 12/699.564 titulada "Nucleic Acid Purification". La Figura 47 muestra el bloque macrofluidico 18 con la cámaras de hisopo 19, disolución de lisis 20, etanol 21, disolución de lavado 22 y disolución de elución 23 y las cámaras de procesamiento fluidico para las cámaras de retención de lisado 24, homogeneización de eluido 25, aire 58, TTE 59 y formamida 60. Las dimensiones del bloque son 102,8 mm x 50,5 mm x 74,7 mm. El bloque macrofluidico utiliza volúmenes desde 0,15 - 3,0 ml e interactúa con el subconjunto neumático y la cubierta. El lado del bloque contiene líneas de conducción neumáticas 26; estas se originan en la interfaz neumática del subconjunto neumático y pasan al bloque a través de este. Desde el bloque, las líneas conductoras pasan a la cubierta. Aunque algunas realizaciones, incluyendo la realización descrita en este Ejemplo 5, incluyen el subconjunto de macroprocesamiento, no todos los biochips según la tecnología descrita en el presente documento incluyen el subconjunto de macroprocesamiento. Por ejemplo, se podría inyectar una muestra de ADN o de células purificadas en un biochip, incluido el subconjunto neumático y el subconjunto fluidico conectados por el conjunto de válvula.

Las Figuras 48 - 54 muestran la cubierta. La cubierta consiste en tres capas. La Figura 48 muestra la parte superior de la capa de cubierta 1 27, la Figura 49 muestra la parte inferior de la capa de cubierta 1 27 y la Figura 50 muestra una vista transparente de la capa de cubierta 1 27. La Figura 51 muestra la capa de cubierta 2 28. La Figura 52 muestra la parte superior de la capa de cubierta 3 29, la Figura 53 muestra la parte inferior de la capa de cubierta 3 29 y la Figura 54 muestra una vista transparente de la capa de cubierta 3 29. Las dimensiones de la cubierta ensamblada son 50,8 mm x 118,4 x 4,5 mm. La cubierta funciona para llevar las líneas de conducción neumáticas desde el lado del bloque a la parte superior de las cámaras macrofluidicas para facilitar la transferencia de reactivos, la formación de burbujas y el procesamiento fluidico. La cubierta también tiene características de ventilación asociadas a las cámaras de hisopo 30 y a las cámaras de contención de eluido 31. Las membranas de ventilación aíslan las cámaras ya que no permiten que el fluido se filtre, mientras que permiten que salga aire para normalizar la presión. La cubierta también sirve para mantener el hisopo en su sitio. Opcionalmente, la tapa o la cubierta del hisopo puede incorporar un mecanismo de bloqueo para mantener la muestra en su sitio.

El bloque macrofluidico y los componentes de la cubierta se fabricaron mediante mecanizado por CNC de un termoplástico. Alternativamente, estas piezas se pueden fabricar mediante moldeo por inyección y moldeo por inyección y compresión, y extrusión. Para moldear el bloque de procesamiento macrofluidico, las relaciones de aspecto son mayores de 2 y en el diseño se incorporan ángulos de inclinación menores de 1 °C. El bloque macrofluidico se unió a la cubierta sujetándolo con una junta y tornillos. El bloque está unido al subconjunto neumático mediante ASP de doble cara. Alternativamente, las uniones del bloque se pueden hacer mediante unión con disolvente y térmica.

En la solicitud de patente en trámite de N.º de serie 12/699.564 titulada "Nucleic Acid Purification" se describen enfoques adicionales al procesamiento macrofluidico. El conjunto de procesamiento macrofluidico ofrece una

flexibilidad sustancial a las aplicaciones del biochip. Los reactivos líquidos y sus volúmenes se pueden modificar fácilmente basándose en los tipos de manipulación de muestras que se realizan. La cámara de hisopo se puede modificar para aceptar una amplia variedad de muestras, incluidos diferentes tipos de hisopos, muestras de sangre y muestras ambientales. En determinadas circunstancias, estos cambios se pueden realizar con cambios mínimos a la pila neumática-válvula- fluídica; por ejemplo, simplemente el cambiar las tortas liofilizadas en la pila permitiría realizar un ensayo de amplificación completamente diferente en un tipo de muestra diferente.

Subconjunto de separación y detección - Este subconjunto se usa para la separación y detección de ácidos nucleicos y consistió en 16 microcanales, cada uno de ellos con una parte de inyección y separación. Una descripción detallada de la separación y detección en biochips de plástico se encuentra en la solicitud N.º de serie 12/080.745, publicada como 2009/0020427 titulada "Plastic Microfluidic Separation and Detection Platforms". Para la inyección de muestras se han utilizado dos enfoques, inyección de carga a presión y cruzada. La Figura 55 muestra el biochip de separación y detección para la inyección a presión 32. Funciona conduciendo neumáticamente la muestra para la separación y detección hasta el inicio de la columna de separación para la inyección electrocinética. La dimensión transversal del canal de separación (90 micras de anchura y 40 micras de profundidad) y la longitud del canal entre el ánodo y el cátodo (24 cm) era igual para todos los canales. Este subconjunto se fabricó mediante estampado sobre una lámina termoplástica fina. Alternativamente, el subconjunto se puede fabricar mediante extrusión o moldeo por inyección. Para proporcionar acceso a los canales desde el subconjunto microfluídico, se fabricaron orificios de paso dentro de la hoja en relieve. Los canales se cubrieron uniéndola una fina lámina termoplástica sobre ellos.

La Figura 56 muestra el biochip de separación y detección para la inyección cruzada para el transporte electrocinético de la muestra para la separación y detección hasta el inicio de la columna de separación para la inyección electrocinética 33. Las dimensiones del biochip son 77,7 mm x 276 mm x 376 micras. La dimensión transversal del canal de separación (90 micras de anchura y 40 micras de profundidad) y la longitud del canal entre el ánodo y el inyector transversal (25 cm) era igual para todos los canales. Seis de los 16 canales estaban activos en este subconjunto. Las longitudes de separación (distancia entre la intersección y la ventana de excitación/ detección) para cada uno de los canales varían de 16 a 20 cm de longitud. El área transversal de los canales entre el pocillo del cátodo y el inyector se ajustó de manera que todas las resistencias eléctricas y, por lo tanto, los campos eléctricos entre el cátodo y la intersección fueran esencialmente iguales bajo polarización. Esto garantizaba que los campos eléctricos experimentados por las muestras fueran idénticos independientemente del canal de separación en el que se cargó una muestra. Las tensiones de intersección para todos los canales fueron esencialmente idénticas. Los brazos de entrada de muestra y de residuos de muestra para la inyección de muestra tenían ambos una longitud de 2,5 mm. El desplazamiento entre ambos canales fue de 500 micras. Este subconjunto se fabricó mediante estampado sobre una hoja termoplástica fina. Alternativamente, el subconjunto se puede fabricar por extrusión o moldeo por inyección. Para proporcionar acceso a los canales desde el subconjunto microfluídico, se fabricaron orificios de paso dentro de la hoja en relieve. Los canales se cubrieron uniéndola mediante disolvente otra lámina termoplástica fina. Alternativamente, la lámina se puede unir mediante unión térmica o unión con disolvente asistida por calor.

El subconjunto de separación y detección (ya sea en formato de carga a presión o de inyección cruzada) se unió al subconjunto fluídico usando cinta adhesiva, y los subconjuntos se orientaron de tal manera que el flujo de ácido nucleico dentro del biochip de separación y detección se realizara en la dirección opuesta a la purificación y amplificación de los AN. Es decir, que los ácidos nucleicos se desplazaron a través del subconjunto de separación y detección en dirección inversa a la del flujo general de fluidos durante la purificación y la amplificación por PCR. Esta inversión de dirección usando lados opuestos del subconjunto permite que el biochip complejo tenga una longitud sustancialmente reducida. La Figura 57 ilustra cómo todas las capas - la cubierta macrofluídica 27, 28 y 29; el bloque macrofluídico 18, la capa neumática con películas superior e inferior 13, 15 y 16; la capa de subconjunto de válvula; la capa fluídica con película superior e inferior 1, 2 y 3; y el biochip de separación y detección 32 o 33 se apilan entre sí para formar el biochip. La Figura 58 es una fotografía del conjunto de biochip 34 con flechas que indican la dirección de los flujos del proceso.

Con referencia a las Figuras 39 y 41, para ejecutar el biochip, antes del ensayo se cargaron los siguientes reactivos en el subconjunto de procesamiento macrofluídico:

- Disolución de lisis (Figura 39, 20), 550 microlitros - reactivo basado en sal caotrópica para lisar células y liberar ADN de las muestras.
- Etanol (Figura 39, 21), 550 microlitros - Junto con la disolución de lisis, lisa las células y facilita la unión de ADN con el filtro de purificación basado en sílice.
- Disolución de lavado (Figura 39, 22), 3 ml - Reactivo basado en etanol para lavar el filtro de purificación para eliminar proteínas y otros materiales biológicos para generar ADN puro.
- Disolución de elución (Figura 39, 23), 300 microlitros, - Reactivo basado en Tris-EDTA que libera el ADN purificado del filtro de purificación y estabiliza el ADN.

- Tampón de TTE (Figura 41, 58), 1,6 ml - Reactivo de electroforesis basado en Tris-Taps-EDTA.

5 • Formamida (Figura 41, 59) 150 microlitros - Disolución de desnaturalización para diluir el producto de PCR para preparar la muestra para la separación y detección. Mezclando la muestra y la formamida a una proporción de aproximadamente 1: 4 (intervalo de 1: 50 a 1 a 1,5), no es necesario realizar calentamiento o enfriamiento rápido para efectuar la desnaturalización. La omisión de las etapas de calentamiento/enfriamiento convencionales simplifica al instrumento.

10 Con referencia a las Figuras 40 y 41, antes del ensayo se cargaron los siguientes reactivos liofilizados en el subconjunto fluido del biochip:

- Torta de PCR Figura 40, 10 - Mezcla de reacción de PCR liofilizada.
- Torta de patrón de carril interno (dimensionamiento) (Internal Lane Standard, ILS) Figura 41, 35 - Fragmentos de ADN liofilizados que están marcados con fluorescencia para permitir que la movilidad electroforética de los fragmentos amplificados se correlacione con los pesos moleculares.

20 Una ventaja de este enfoque es que todos los reactivos liofilizados se ubican dentro de un subconjunto. Esto permite mejorar la gestión de la cadena de suministro ya que las condiciones de llenado de tortas liofilizadas (baja humedad y estática) son muy diferentes y mucho más exigentes que las de llenado de líquidos. Por consiguiente, los reactivos líquidos y liofilizados se pueden llenar por separado y en paralelo. Opcionalmente, se puede introducir una torta liofilizada que contiene una escalera alélica y fragmentos de ILS en la cámara de torta superior 35 para las ejecuciones analíticas de STR.

25 Antes de realizar el ensayo, el siguiente reactivo se cargó en la sección de separación y detección del biochip :

- Matriz de tamizado (Figura 55, 36 y Figura 56, 36) - Disolución de poliacrilamida lineal de alto peso molecular para el tamizado electroforético de ADN.

30 El biochip se insertó en un solo instrumento, completamente integrado, que contenía los siguientes subsistemas (Figura 59) como se describe en la solicitud de patente de EE. UU. N.º de serie 12/396.110, titulada Ruggedized Apparatus for Analysis of Nucleic Acid and Proteins, publicada como 2009/0229983 (véanse, por ejemplo, los párrafos 65-76); la solicitud de patente de EE. UU. N.º de serie 12/080.746 titulada Methods for Rapid Multiplexed Amplification of Target Nucleic Acids, publicada como 2009/0023602 (véanse, por ejemplo, los párrafos 54 y 56-67); solicitud de patente de EE. UU. N.º de serie 12/080.751 titulada Integrated Nucleic Acid Analysis, publicada como 2009/0059222 (véanse, por ejemplo, los párrafos 139-144); solicitud de patente de EE. UU. N.º de serie 12/080.745, titulada Plastic Microfluidic Separation and Detection Platforms, publicada como 2009/0020427 (véase, por ejemplo, el párrafo 95). Los subsistemas incluyen:

40 Subsistema neumático - Una bomba neumática y de vacío está conectada a un colector neumático (Figura 44, 61 como se describe en el Ejemplo 4) a través de un conjunto de tanques y válvulas solenoides. Este colector está a su vez conectado a los puertos neumáticos del biochip a través de la interfaz neumática. El controlador de proceso controla las válvulas solenoides.

45 Subsistema térmico - Un sistema de termociclado basado en peltier está acoplado a las cámaras de termociclado (Figura 35, 62) del biochip para hacer un ciclo rápido de las reacciones dentro de estos canales. Como se señaló en el Ejemplo 4, una abrazadera aplica presión a la región de amplificación para permitir una transferencia térmica eficaz con el termociclador. El controlador de proceso controla las temperaturas de reacción y los tiempos de residencia.

50 Subsistema de alta tensión - Una fuente de alimentación de alta tensión está acoplada a las partes de ánodo (Figura 55, 63) y cátodo (Figura 55, 64) del biochip de separación. Hay que tener en cuenta que los electrodos del ánodo pasan a través de las placas neumáticas y fluidicas en la porción del ánodo (Figura 44, 65 y Figura 35, 65) y el electrodo del cátodo se incorpora en la porción del cátodo dentro de la placa fluidica y las placas neumáticas (Figura 44, 66 y Figura 35, 66) para acceder al biochip de separación y detección. La aplicación de una alta tensión genera un campo eléctrico a lo largo de los canales para efectuar la pre-electroforesis, la inyección de la muestra y la separación y detección. El controlador de proceso controla el subsistema de alta tensión.

60 Subsistema óptico - Un sistema óptico está acoplado a la ventana de excitación y detección del biochip de separación y detección que está dentro del biochip (Figura 55, 67 y 56, 67). Hay que tener en cuenta que la luz pasa a través de una ventana abierta en las placas neumática y fluidica (en referencia a la Figura 44, 38 y a la Figura 35, 37). El sistema óptico consiste en un láser que se usa para inducir la fluorescencia a partir de fragmentos de ADN marcados dentro del canal de separación. Para separar los componentes de longitud de onda de la fluorescencia se usa un conjunto de espejos dicróicos. Para detectar las señales de fluorescencia se utiliza un conjunto de tubos fotomultiplicadores. Para transferir luz (excitación láser y fluorescencia emitida) entre el láser y el biochip de separación y detección, y el biochip de separación y detección y los detectores, se usa un conjunto de componentes

ópticos. El controlador de proceso controla el subsistema óptico.

Controlador de proceso - Un controlador basado en un ordenador que puede aceptar un programa de proceso predefinido e implementar el programa automáticamente al leer el programa y, por consiguiente, controlando los subsistemas. Hay que tener en cuenta que el ordenador también realiza el procesamiento y análisis de datos según sea necesario.

El proceso de inserción de muestras hasta la obtención de resultados se realizó de la siguiente manera. Se recogieron cinco hisopos de donantes. Los hisopos se recogieron presionando la cabeza de un hisopo Bode Secur-swab en el interior de la mejilla siguiendo las instrucciones del fabricante. Cada uno de los 5 hisopos se insertó en una de las cámaras de hisopo del biochip, el biochip se colocó en el instrumento y se inició el programa del proceso automatizado para llevar a cabo el análisis de inserción de hisopo y obtención de resultados. Se ejecutó un programa automatizado con las siguientes etapas:

- *Inicialización.* Todas las válvulas en el biochip se cerraron aplicando presión en las líneas de válvula. Las válvulas en el Ejemplo 5 se activaron con una presión de 137,8 kPa (20 psig)* para cerrarlas y se ventilaron a la atmósfera para abrirlas. La excepción es la válvula V3 (Figura 39, 41), que se mantuvo en la posición abierta mediante la aplicación de un vacío de -75,84 kPa (-11 psig)** Por simplicidad, se hace referencia a los números de válvula basándose en su posición con respecto a la placa neumática (aunque las válvulas se encuentran realmente dentro del conjunto de válvula). *: 1,4 bares; **: -0,8 bares
- *Lisis.* Se cargaron neumáticamente 550 microlitros de disolución de lisis desde la cámara de reactivos de lisis (Figura 39, 20) en la cámara de hisopo (Figura 39, 19) abriendo la válvula V1 (Figura 39, 39) y aplicando una presión de 20,68 kPa (3 psig) a la línea de conducción DL1 (Figura 39, 68) durante 30 segundos y después de 37,92 kPa (5,5 psig)* durante 60 segundos. La válvula V1 (Figura 39, 39) se cerró y la línea de conducción 1 (Figura 39, 68) se desactivó. Se cargaron neumáticamente 550 microlitros de etanol desde la cámara de reactivos de etanol (Figura 39, 21) en la cámara de hisopo (Figura 39, 19) abriendo la válvula V2 (Figura 39, 40) y aplicando una presión de conducción de 37,92 kPa (5,5 psig)* a la línea de conducción 2 (Figura 39, 69) durante 30 segundos. *: 0,38 bares
- *Burbujeo caótico.* Se introdujo aire neumáticamente en la cámara de hisopo (Figura 39, 19) abriendo la válvula V2 (Figura 39, 40) y aplicando una presión neumática de 37,92 kPa (5,5 psig)* a la línea de conducción 2 (Figura 39, 69) durante 30 segundos. La válvula 2 (Figura 39, 40) se cerró y la línea de conducción 2 (Figura 39, 69) se desactivó. El aire que se condujo al interior de la cámara de hisopo burbujeaba a través de la disolución de lisis agitando caóticamente tanto el reactivo de lisis como la cabeza del hisopo. Esto causó la lisis de las células y liberó el ADN. *: 0,38 bares
- *Colocación en la cola.* El lisado se extrajo de la cámara de hisopo (Figura 39, 19) a través de un filtro de partículas (Figura 39, 11) al interior de una cámara de contención (Figura 39, 24) manteniendo la válvula V3 (Figuras 39, 41) en posición abierta al mismo tiempo que se aplicaba un vacío de -48,20 kPa (-7 psig)* a la línea de conducción 3 (Figura 39, 70) durante 30 segundos para transferir el lisado. La válvula 3 (Figura 39, 41) se cerró y la línea de conducción 3 (Figura 39, 70) se desactivó. *: -0,48 bares
- *Unión de ADN.* El lisado de la cámara de contención (Figura 39, 24) se condujo neumáticamente a través del filtro de purificación (Figura 39, 12) y al interior de la cámara de hisopo (Figura 39, 19) abriendo la válvula V4 (Figuras 39, 42) y un conjunto de válvulas V5 (Figura 39, 43) y aplicando una presión de 34,47 kPa (5 psig)** durante 60 segundos a la línea de conducción DL3 (Figura 39, 70). Las válvulas V4 (Figura 39, 42) y V5 (Figura 39, 43) se cerraron y la línea de conducción DL3 (Figura 39, 70) se desactivó. El ADN dentro del lisado se unió al filtro de purificación (Figura 39, 12). Hay que tener en cuenta que la cámara de hisopo también sirve como una cámara de residuos después de la generación y el procesamiento del lisado; este doble uso eliminó la necesidad de otra cámara de gran volumen en el bloque macrofluidico. Si se desea la retención de lisado, se pueden incluir opcionalmente cámaras de residuos distintas. **: 0,34 bares
- *Lavado.* La disolución de lavado se condujo neumáticamente desde la cámara de reactivos de lavado (Figura 39, 22) a través del filtro de purificación (Figura 39, 12) al interior de la cámara de hisopo (Figura 39, 19) abriendo las válvulas V5 (Figura 39, 43) y V6 (Figura 39, 46), y aplicando una presión neumática de 89,63 kPa (13 psig)* a la línea de conducción DL4 (Figura 39, 71) durante 90 segundos. Las válvulas V5 (Figura 39, 43) y V6 (Figura 39, 46) se cerraron y la línea de conducción DL4 (Figura 39, 71) se desactivó. Se pasaron 3 ml de lavado a través del filtro de purificación para eliminar contaminantes y restos de partículas del ADN unido. Dos lavados adicionales permitieron la limpieza de canales adyacentes. *: 0,9 bares
- *Secado.* El aire se condujo neumáticamente a través del filtro de purificación (Figura 39, 12) y al interior de la cámara de hisopo (Figura 39, 19) abriendo las válvulas V5 (Figura 39, 43) y V6 (Figura 39, 46), y aplicando una presión de 89,63 kPa (13 psig)* a la línea de conducción DL4 (Figura 39, 71) durante 185 segundos. Las válvulas V5 y V6 se cerraron y la línea de conducción DL4 (Figura 39, 71) se desactivó. El aire secó de parcial a totalmente el filtro de purificación. *: 0,9 bares

- 5 • *Elución.* El tampón de elución se conduce neumáticamente desde la cámara de reactivos de elución (Figura 39, 23) a través del filtro de purificación (Figura 39, 12) y al interior de una cámara de contención de eluido (Figura 39, 25) abriendo las válvulas V6 (Figura 39, 46), V7 (Figura 39, 45) y V8 (Figura 39, 47) y aplicando una presión de 34,47 kPa (5 psig)* a la línea de conducción DL5 (Figura 39, 72) durante 120 segundos. Las válvulas V6 (Figura 39, 46), V7 (Figura 39, 45) y V8 (Figura 39, 47) se cerraron y DL5 (Figura 39, 72) se desactivó. Para liberar el ADN purificado que estaba unido al filtro de purificación, se pasaron 300 microlitros de tampón de elución a través del filtro de purificación (Figura 39, 12).
- 10 • *Homogeneización.* El aire se condujo neumáticamente al interior de la cámara de contención de eluido abriendo las válvulas V6 (Figura 39, 46) y V8 (Figura 39, 47) y aplicando una presión de 34,47 kPa (5 psig)* a la línea de conducción DL4 (Figura 39, 71) durante 60 segundos. Las válvulas V6 (Figura 39, 46) y V8 (Figura 39, 47) se y DL4 (Figura 39, 71) se desactivó. El aire que se condujo al interior de la cámara de contención de eluido burbujea a través del eluido para agitar y homogeneizar el ADN dentro del eluido. Opcionalmente, una parte del eluido puede dirigirse a una cámara de almacenamiento o a un filtro de almacenamiento si se desea una muestra de retención del ADN purificado. *: 0,34 bares
- 20 • *Dosificación de eluido.* El eluido se condujo neumáticamente desde la cámara de contención de eluido (Figura 39, 25) al interior de las cámaras de dosificación de eluido (Figura 40, 8) abriendo la válvula V10 (Figura 39, 48) y aplicando a la DL6 (Figura 39, 73) una presión de 6,89 kPa (1 psig) durante 40 segundos. La válvula V10 (Figura 39, 48) se cerró y la DL6 (Figura 39, 73) se desactivó. Cada eluido se llenó en la cámara de dosificación y se detuvo en una membrana de ventilación. El exceso de eluido se condujo neumáticamente de nuevo al interior de la cámara de contención de eluido abriendo las válvulas V10 (Figura 39, 48) y V11 (Figura 40, 50) y aplicando una presión de 13,79 kPa (2 psig)* a la línea de conducción DL7 (Figura 40, 49) durante 25 segundos. Las válvulas V10 (Figura 39, 48) y V11 (Figura 40, 50) se cerraron y la DL7 (Figura 40, 49) se desactivó. *: 0,14 bares
- 30 • *Reconstitución de la torta de PCR.* El eluido se condujo neumáticamente desde la cámara de dosificación de eluido (Figura 40, 8) al interior de la cámara de la torta de PCR (Figura 40, 10) abriendo las válvulas V11 (Figura 40, 50) y V12 (Figura 40, 51) y aplicando una secuencia de conducción de 1,37 kPa (0,2 psig) durante 30 segundos, después 2,74 kPa (0,4 psig) durante 30 segundos, después 4,13 kPa (0,6 psig) durante 60 segundos a la línea de conducción DL7 (Figura 41, 49).** Las válvulas V11 (Figura 40, 50) y V12 (Figura 40, 51) se cerraron y (Figura 41, 49) se desactivó. Para generar la mezcla de PCR para amplificación, se transfirieron 20,5 microlitros de eluido medido para reconstituir la torta que contenía la mezcla de reacción de PCR liofilizada.
- 35 • *Transferencia al interior de la cámara de termociclado.* La mezcla de reacción de PCR se condujo neumáticamente desde la cámara de la torta (Figura 40, 10) al interior de las cámaras de termociclado (Figura 40, 62) abriendo las válvulas V11 (Figura 40, 50), V12 (Figura 40, 51), V13 (Figura 40, 52) y V14 (Figura 40, 53), y aplicando una secuencia de presión de conducción secuencialmente en aumento de 1,37 kPa (0,2 psig) durante 30 segundos, y después de 2,74 kPa (0,4 psig) durante 30 segundos, después 4,13 kPa (0,6 psig) durante 30 segundos a la línea de conducción DL7 (Figura 40, 49)**. Las válvulas V11 (Figura 40, 50), V12 (Figura 40, 51), V13 (Figura 40, 52) y V14 (Figura 40, 53) se cerraron, y la DL7 (Figura 40, 49) se desactivó. La mezcla de reacción de PCR se transfirió al interior de las cámaras de termociclado y se detuvo en la membrana de ventilación de la cola. **: 0,014 bares durante 30 segundos, después 0,028 bares durante 30 segundos, después 0,041 bares durante 60 segundos
- 45 • *Termociclado.* Para generar amplicones marcados, se aplicó un protocolo de treinta y un ciclos para ciclar la reacción dentro de las cámaras de termociclado (Figura 40, 62) (véase, Giese, H., et al. (2009). "Fast multiplexed polymerase chain reaction for conventional and microfluidic short tandem repeat analysis". *J Forensic Sci* **54**(6): 1287-96, y la solicitud N.º de serie 12/080.746, publicada como 2009/0023603, titulada "Methods for Rapid Multiplexed Amplification of Target Nucleic Acids". Las condiciones de ciclado fueron las siguientes: Arranque en caliente a 93 °C x 20 segundos seguido de 31 ciclos de (93 °C x 4 segundos, 56 °C x 15 segundos y 70 °C x 7 segundos) seguido de una extensión final de 70 °C x 90 segundos.
- 50 • *Dosificación del producto de PCR.* El producto de PCR se condujo neumáticamente desde las cámaras de termociclado (Figura 40, 62) al interior de la cámara de dosificación de PCR (Figura 41, 74) abriendo las válvulas V11 (Figura 40, 50), V12 (Figura 40, 51), V13 (Figura 40, 52), V14 (Figura 40, 53) y V30 (Figura 41, 111), y aplicando una secuencia de presión de conducción secuencialmente en aumento de 1,37 kPa (0,2 psig) durante 30 segundos, después de 2,74 kPa (0,4 psig) durante 30 segundos, después de 4,13 kPa (0,6 psig) durante 45 segundos a la línea de conducción DL7 (Figura 40, 49)*. Las válvulas V11 (Figura 40, 50), V12 (Figura 40, 51), V13 (Figura 40, 52), V14 (Figura 40, 53) y V30 (Figura 41, 111) se cerraron y la DL7 (Figura 40, 49) se desactivó. El producto de PCR fluye al interior de la cámara de dosificación y se detiene en una membrana de ventilación. *: 10,014 bares durante 30 segundos, después 0,028 bares durante 30 segundos, después 0,041 bares durante 60 segundos;
- 65 • *Dosificación de formamida.* La formamida se condujo neumáticamente desde la cámara de reactivo de formamida (Figura 41, 60) al interior de la cámara de dosificación de formamida (Figura 41, 76) aplicando una

presión de 6,89 kPa (1 psig) durante 50 segundos a la línea de conducción DL8 (Figura 41, 75). La línea de conducción DL8 (Figura 41, 75) se desactivó. En esta etapa, se dosificó una 6ª parte del volumen de formamida (Figura 41, 77) para reconstituir una torta para generar una muestra de control. La formamida fluye al interior de la cámara de dosificación y se detiene en una membrana de ventilación. El exceso de formamida se conduce neumáticamente desde la cámara de formamida al interior de una cámara de residuos abriendo la válvula V15 (Figura 41, 54) y aplicando una presión de 20,68 kPa (3 psig) durante 180 segundos*¹ a la línea de conducción DL8 (Figura 41, 75). La válvula V15 (Figura 41, 54) se cerró y la DL8 (Figura 41, 75) se desactivó. Todo el exceso de la cámara de reactivo de formamida y de la línea de conducción se transfirió a la cámara de residuos.

- *Unión del producto de formamida-PCR.* El producto de PCR medido se condujo neumáticamente desde la cámara de dosificación de PCR (Figura 41, 74) al interior de la cámara de unión (Figura 41, 78) abriendo la válvula V18 (Figura 41, 57), V17 (Figura 41, 80) y V20 (Figura 41, 81) y aplicando un perfil de conducción de 4 etapas de 1,37, 2,06, 2,75 y 3,44 kPa (0,2, 0,3, 0,4 y 0,5 psig) durante 30, 30, 30 y 30 segundos*² respectivamente, a la línea de conducción DL9 (Figura 41, 79). Las válvulas V18 (Figura 41, 57), V17 (Figura 41, 80) y V20 (Figura 41, 81) se cerraron y la DL9 (Figura 41, 79) se desactivó. La formamida medida se condujo neumáticamente desde la cámara de dosificación de formamida (Figura 41, 76) al interior de la cámara de unión (Figura 41, 78) abriendo las válvulas V16 (Figura 41, 55) y V20 (Figura 41, 81) y aplicando una presión en aumento de 1,37, 2,75 y 4,13 kPa (0,2, 0,4 y 0,6 psig) durante 30, 30 y 60 segundos a la línea de conducción DL8 (Figura 41, 75). Las válvulas V16 (Figura 41, 55) y V20 (Figura 41, 81) se cerraron y la DL8 (Figura 41, 75) se desactivó. La cámara de unión permite que tanto el producto de PCR medido como la formamida medida, que se originan a partir de dos flujos independientes, se combinen para formar la muestra para la separación y detección. *: 0,014, 0,028 y 0,041 bares

*1: 0,21 bares; *2: 0,014, 0,021, 0,028 y 0,034 bares

- *Reconstitución de la torta de ILS.* Para la separación y detección, la muestra se condujo neumáticamente al interior de las cámaras de torta ILS (Figura 41, 35) abriendo las válvulas V16 (Figura 41, 55) y V19 (Figura 41, 56), y aplicando una presión en aumento de 1,37, 2,75 y 4,13 kPa (0,2, 0,4 y 0,6 psig)* durante 30, 30 y 60 segundos a la línea de conducción DL8 (Figura 41, 75). Las válvulas V16 (Figura 41, 55) y V19 (Figura 41, 56) se cerraron y la DL8 (Figura 41, 75) se desactivó. Para la separación y detección, la muestra que estaba compuesta por 4,1 microlitros de producto de PCR y 16,4 microlitros de formamida reconstituyó la torta de ILS dentro de la cámara para generar la muestra de separación y detección. *: 0,014, 0,028 y 0,041 bares

- *Reconstitución de la torta de control+ILS.* El 6º del volumen medido de formamida se condujo neumáticamente al interior de la cámara de control+torta ILS (Figura 41, 83) abriendo las válvulas V16 y V20, y aplicando una presión en aumento de 1,37, 2,75 y 4,13 kPa (0,2, 0,4 y 0,6 psig)* durante 30, 30 y 60 segundos a la línea de conducción DL9. Las válvulas V16 y V20 se cierran y la DL9 se desactiva. Los 20,5 microlitros de formamida reconstituyeron la torta dentro de la cámara para generar la muestra de separación y detección. *: 0,014, 0,028 y 0,041 bares

- *Inyección de muestras en el canal de separación.* Las 6 muestras de separación y detección se condujeron neumáticamente desde las cámaras de torta (Figura 41, 35 y 82) a través de una cámara de eliminación de burbujas (Figura 41, 83) para llenar la cámara de cátodo (Figura 41, 84) y una cámara de residuos de muestra (Figura 41, 85) abriendo la válvula V21 (Figura 41, 86) y V22 (Figura 41, 87) y aplicando una presión a la línea de conducción DL8 (Figura 41, 74) con un perfil secuencialmente escalonado de 2,75, 4,13, 6,89, 10,34 y 13,79 MPa (0,4, 0,6, 1,0, 1,5 y 2,0 psig)* durante 30, 30, 30, 30 y 30 segundos respectivamente, (Figura 41, 86) y V22 (Figura 41, 87) se cerraron y la DL8 (Figura 41, 74) se desactivó. El ADN dentro de la muestra se inyectó desde la cámara de cátodo (Figura 41, 84) en la parte de separación del biochip (Figura 56 y Figura 55, 88), aplicando una tensión de 4400 V para polarizar el cátodo (Figura 55 y 56, 63) y el ánodo (Figura 55 y 56, 64) durante 35 segundos. *: 0,028, 0,041, 0,069, 0,103 y 0,138 bares

- *Separación y detección de ADN.* El TTE se condujo neumáticamente desde el depósito de reactivo TTE (Figura 41, 59) para llenar el cátodo (Figura 41, 84) y para llenar las cámaras de residuos de TTE (Figura 41, 92, 93 y 13) abriendo las válvulas V25 (Figura 41, 91), V24 (Figura 41, 90), V26 (Figura 41, 95), V27 (Figura 41, 96) y V28 (Figura 41, 97) y aplicando una presión a la línea de conducción DL10 (Figura 41, 98) de 13,79 kPa (2 psig)* durante 240 segundos. Las válvulas V25 (Figura 41, 91), V24 (Figura 41, 90), V26 (Figura 41, 95), V27 (Figura 41, 96) y V28 (Figura 41, 97) se cerraron y la DL10 (Figura 41, 98) se desactivó. El flujo de TTE a través de los cátodos desplazó la muestra dentro de los cátodos. El ADN que se inyectó en la parte de separación del biochip S&D (Figura 55) se desplazó por la parte de separación del biochip (Figura 56, 88), cuando se aplicaron 6.400 V para polarizar el cátodo (Figura 55 y 56, 63) y el ánodo (Figura 55 y 56, 64) durante 30 minutos. El sistema óptico también se activó para efectuar la excitación y detección de fluorescencia inducida por láser en la ventana de excitación y detección. El láser se ajustó a 200 mW y se implementó la velocidad de recogida de datos de 5 Hz. La señal fluorescente se desplazó a través de la trayectoria de detección a los tubos fotomultiplicadores. Allí, la fluorescencia se transformó en una señal que se registra por el software del sistema. *: 0,138 bares.

Siguiendo las etapas de proceso programadas como se indicó anteriormente, se generaron electroferogramas (Figura 60 y 61). El electroferograma de control (Figura 60) se generó para la muestra de control ILS (fragmentos marcados con fluorescencia usando ROX). El eje x representa los recuentos de recogida de datos, indicando cada recuento el momento en el que el fragmento marcado llega a la zona de detección. Algunos de los patrones de tamaño se indican con flechas, y los fragmentos de menor peso molecular migran más rápidamente que los fragmentos de mayor peso molecular y se detectan antes (es decir, a la izquierda del gráfico). El eje Y muestra las unidades relativas de fluorescencia (urf) para cada pico. La Figura 61 muestra los tamaños de los fragmentos de STR generados para una muestra de hisopo bucal. Cada uno de los colorantes de fluorescencia usados para marcar los cebadores de STR en la mezcla de reacción de PCR y los ILS se muestran en paneles individuales. En el panel superior se muestran los fragmentos marcados con fluoresceína, los fragmentos marcados con JOE se muestran en el segundo panel desde la parte superior, los fragmentos marcados con TAMRA se muestran en el tercer panel desde la parte superior y los fragmentos ILS marcados con ROX se muestran en el panel inferior. Los ejes x e y son los mismos que los descritos para la Figura 60. Todo el proceso, desde la inserción de las muestras hasta la generación del electroferograma, requirió aproximadamente 90 minutos y aproximadamente 215 etapas programadas de proceso. Se pueden acortar muchas etapas del proceso, y si se desea, el proceso se puede realizar en menos de 45 minutos.

Ejemplo 6 Moldeo por inyección de un biochip completamente integrado que purifica ácidos nucleicos, amplifica el ADN purificado, separa electroforéticamente el ADN amplificado y genera un perfil de STR usando un programa automatizado.

Este biochip se parece al del Ejemplo 5, con las placas fluidica y neumática fabricadas mediante moldeo por inyección. El biochip de plástico, unitario y estacionario, que acepta 5 hisopos bucales y que genera perfiles de STR, consiste en las siguientes partes:

Subconjunto fluidoico - Este subconjunto transfiere y procesa fluidos dentro del biochip, interaccionando con el subconjunto neumático, subconjunto de procesamiento macrofluidico, subconjunto de válvulas y subconjunto de separación y detección. Se fabricó mediante moldeo por inyección de COP con un conjunto interconectado de canales, cámaras y características de membrana y filtro en los lados superior e inferior de la lámina termoplástica. La Figura 62 muestra el lado superior de la placa fluidica 601, la Figura 63 muestra el lado inferior de la placa fluidica 601 y la Figura 64 muestra una vista transparente de la placa fluidica 601, mostrando las características de ambos lados. La Figura 65 muestra una fotografía de la placa fluidica 601 moldeada por inyección. La placa fluidica moldeada por inyección tiene dimensiones de 276 mm x 117 mm x 2,5 mm. Los lados superior e inferior de la placa están cubiertos con películas de plástico finas estampadas. La Figura 66 muestra la película fina estampada superior 602 y la Figura 67 muestra la película fina estampada inferior 603.

En la Figura 68 se muestra la trayectoria de flujo para una sola muestra dentro de la placa fluidica moldeada por inyección. La muestra que fluye por la trayectoria 4 pasa a través de una sección de purificación (Figura 68, 5), sección de PCR (Figura 68, 6) y sección de separación y detección (Figura 68, 7). Las vistas ampliadas de la sección de purificación, sección de PCR y secciones de separación y detección se muestran en las Figuras 69, 70 y 71, respectivamente. La placa fluidica moldeada por inyección tiene una región de filtro de partículas (Figura 69, 11), una región de membrana de purificación (Figura 69, 12) y varios tipos de cámaras, incluyendo cámaras de dosificación (Figura 69, 8), cámaras de reconstitución (Figura 69, 10), cámaras de unión (Figura 70, 78), cámaras de residuos (Figura 70, 92, 93 y 94), y cátodos (Figura 71, 84) y un ánodo (Figura 64, 65).

Los lados superior e inferior de la placa fluidica se cubrieron con películas de plástico finas estampadas y se unieron mediante unión con disolvente. La unión de las películas finas estampadas con la placa fluidica también se puede realizar ultrasónicamente, térmicamente y usando adhesivos. Para facilitar el método de unión se pueden añadir características a la placa y a las películas; por ejemplo, en los lugares de soldadura ultrasónica se pueden colocar aristas conductoras de energía. Las películas finas tienen un espesor de 100 micras y se fabricaron mediante mecanizado por CNC; opcionalmente, se pueden fabricar mediante troquelado o corte con láser. Las características en las películas de plástico finas incluyen orificios de paso y se alinearon con las características correspondientes en la capa moldeada por inyección para proporcionar acceso a la capa fluidica de tipo sándwich. Las membranas de purificación (Figura 69, 12), los filtros de partículas (Figura 69, 11) y las membranas de ventilación se unieron a este subconjunto mediante soldadura térmica antes de la unión de las películas finas. Similarmente, estas membranas y filtros se pueden unir mediante soldadura ultrasónica y encastrado térmico.

Subconjunto neumático - Este subconjunto acopla la conducción neumática del instrumento al subconjunto fluidoico (como se describe en el Ejemplo 4) para conducir neumáticamente fluidos dentro del subconjunto fluidoico y para activar neumáticamente válvulas dentro del biochip. Este subconjunto se fabricó mediante moldeo por inyección de COP con un conjunto interconectado de canales, cámaras y características de membrana y filtro en los lados superior e inferior de la lámina termoplástica. La Figura 72 muestra el lado superior de la placa neumática, la Figura 73 muestra el lado inferior de la placa neumática y la Figura 74 muestra una vista transparente de la placa neumática, que muestra las características de ambos lados. La Figura 75 muestra una fotografía de la placa neumática moldeada por inyección. La placa neumática moldeada por inyección tiene dimensiones de 277,6 mm x 117,7 mm x 2,50 mm. Después de la unión, todas las características del subconjunto neumático se alinean con las

características del subconjunto fluido. El lado superior de la placa se cubre con una película de plástico fina estampada con orificios de paso para permitir el acceso a la placa. La Figura 76 muestra la película fina estampada superior. El lado inferior de la placa se cubre cuando la película fina estampada que representa el subconjunto de válvula se une mediante unión con disolvente; la película fina está estampada mediante mecanizado por CNC. Las películas finas tienen un espesor de 100 micras. Los patrones se pueden cortar antes de la unión o después de la unión. Antes de la unión de las películas finas superior e inferior con la placa neumática, se incorporan membranas de ventilación (Figura 68, 17). La fijación de las películas finas con la placa neumática se realizó con disolventes, pero también se puede realizar ultrasónicamente, térmicamente y usando adhesivos.

El subconjunto de procesamiento macrofluido y el subconjunto de separación y detección son iguales a los descritos en el Ejemplo 5. En este biochip, el conjunto de válvula es una película termoplástica fina que tiene 40 micras, 50 micras o 100 micras de espesor. La capa de válvula rígida accionada neumáticamente (descrita en el Ejemplo 2) separa los conjuntos neumático y fluido. Cuando se activa neumáticamente, esta capa se desvía para controlar el flujo de fluidos (incluido el aire) dentro de la capa fluida.

El subconjunto de pila neumática-válvula-fluida se fabricó mediante unión con disolvente del conjunto neumático con el conjunto fluido. Las cámaras y canales en el lado inferior de la placa neumática se sellan cuando el disolvente se une a la capa fluida. El bloque macrofluido se unió a la cubierta sujetándolo usando una junta y tornillos. El bloque se fijó al subconjunto neumático usando cinta ASP de doble cara. Alternativamente, las uniones del bloque se pueden hacer mediante unión con disolvente y térmica. Finalmente, el subconjunto de separación y detección se fijó al subconjunto fluido usando cinta ASP, y los subconjuntos se orientaron de modo que el flujo de ácido nucleico dentro del biochip de separación y detección se condujo en dirección opuesta a la purificación y amplificación de AN.

Para examinar el biochip, los reactivos líquidos y liofilizados se cargan como se describe en el Ejemplo 5 y el biochip se inserta en el instrumento completamente integrado del Ejemplo 5. Se recogen cinco hisopos bucales de donantes, y cada uno de los 5 hisopos se inserta en una de las cámaras de hisopo del biochip. Se ejecutó un programa automatizado con las siguientes etapas:

- *Inicialización.* Todas las válvulas del biochip se cierran aplicando una presión de 517,1 kPa (75 psig)* en todas las líneas de válvula. La excepción es la válvula V3 que se mantuvo en la posición abierta mediante la aplicación de un vacío de -75,84 (-11 psig)**. Por simplificar, se hace referencia a los números de válvula en función de su posición con respecto a la placa neumática (aunque las válvulas se encuentran realmente dentro del conjunto de válvula). *: 5,2 bares; -:0,76 bares
- *Lisis.* Se cargan neumáticamente 550 microlitros de disolución de lisis desde la cámara de reactivos de lisis (Figura 69, 20) al interior de la cámara de hisopo (Figura 69, 19) abriendo la válvula V1 (Figuras 69, 39) y aplicando una presión de 20,68 kPa (3 psig) a la línea de conducción DL1 (Figuras 69, 68) durante 30 segundos y después de 37,92 kPa (5,5 psig)* durante 60 segundos. La válvula V1 (Figura 69, 39) está cerrada y la línea de conducción 1 (Figuras 69, 68) está desactivada. Se cargan neumáticamente 550 microlitros de etanol desde la cámara de reactivos de etanol (Figura 69, 21) al interior de la cámara de hisopo (Figura 69, 19) abriendo la válvula V2 (Figura 69, 40) y aplicando una presión de conducción de 37,92 kPa (5,5 psig)* a la línea de conducción 2 (Figuras 69, 69) durante 30 segundos. *: 0,38 bares
- *Burbujeo caótico.* El aire se conduce neumáticamente al interior de la cámara de hisopo (Figura 69, 19) abriendo la válvula V2 (Figura 69, 40) y aplicando una presión neumática de 37,92 kPa (5,5 psig)* a la línea de conducción 2 (Figura 69, 69) durante 30 segundos. La válvula 2 (Figura 69, 40) está cerrada y la línea de conducción 2 (Figura 69, 69) está desactivada. El aire que se condujo al interior de la cámara de hisopo, burbujeaba a través de la disolución de lisis agitando caóticamente tanto el reactivo de lisis como la cabeza del hisopo. Esto causó la lisis de las células y liberó el ADN. *: 0,38 bares
- *Colocación en la cola.* El lisado se extrae de la cámara de hisopo (Figura 69, 19) a través de un filtro de partículas (Figura 69, 11) al interior de una cámara de retención (Figura 69, 24) manteniendo la válvula V3 (Figura 69, 41) en la posición abierta mientras se aplica un vacío de -48,26 kPa (-7 psig)* a la línea de conducción 3 (Figura 69, 70) durante 30 segundos. La válvula 3 (Figura 69, 41) está cerrada y la línea de conducción 3 (Figura 69, 70) está desactivada. *: -0,48 bares
- *Unión de ADN.* El lisado de la cámara de retención (Figuras 69, 24) se conduce neumáticamente a través del filtro de purificación (Figura 69, 12) y al interior de la cámara de hisopo (Figura 69, 19) abriendo la válvula V4 (Figura 69, 42) y un conjunto de válvulas V5 (Figura 69, 43) y aplicando una presión de 34,47 kPa (5 psig)* durante 60 segundos a la línea de conducción DL3 (Figuras 69, 70). Las válvulas V4 (Figura 69, 42) y V5 (Figura 69, 43) se cerraron y la DL3 (Figura 69, 70) se desactivó. El ADN dentro del lisado se une al filtro de purificación (Figura 69, 12). Hay que tener en cuenta que la cámara de hisopo también sirve como una cámara de residuos después de la generación y el procesamiento del lisado; este doble uso elimina la necesidad de otra cámara de gran volumen en el bloque macrofluido. Si se desea la retención de lisado, se pueden incluir opcionalmente cámaras de residuos distintas. *: 0,38 bares

- 5 • *Lavado*. La disolución de lavado se conduce neumáticamente desde la cámara de disolución de lavado (Figura 69, 22) a través del filtro de purificación (Figura 69, 12) al interior de la cámara de hisopo (Figura 69, 19) abriendo las válvulas V5 (Figura 69, 43) y V6 (Figura 69, 46), y aplicando una presión neumática de 89,63 kPa (13 psig)* a la línea de conducción DL4 (Figura 69, 71) durante 90 segundos. Las válvulas V5 (Figura 69, 43) y V6 (Figura 69, 46) se cerraron y la línea de conducción DL4 (Figura 69, 71) se desactivó. Se pasaron 3 ml de lavado a través del filtro de purificación para eliminar contaminantes y restos de partículas del ADN unido. Dos lavados adicionales permiten limpiar canales adyacentes. *: 0,9 bares
- 10 • *Secado*. El aire se conduce neumáticamente a través del filtro de purificación (Figura 69, 12) y al interior de la cámara de hisopo (Figura 69, 19) abriendo las válvulas V5 (Figura 69, 43) y V6 (Figura 69, 46), y aplicando una presión de 89,63 kPa (13 psig)* a la línea de conducción DL4 (Figura 69, 71) durante 185 segundos. Las válvulas V5 y V6 se cierran y la DL4 (Figura 69, 71) se desactiva. El aire seca de parcial a totalmente el filtro de purificación. *: 0,9 bares
- 15 • *Elución*. El tampón de elución se conduce neumáticamente desde la cámara de reactivos de elución (Figura 69, 23) a través del filtro de purificación (Figura 69, 12) y al interior de una cámara de retención de eluido (Figura 69, 25) abriendo las válvulas V6 (Figura 69, 46), V7 (Figura 69, 45) y V8 (Figura 69, 47) y aplicando una presión de 34,47 kPa (5 psig)* a la línea de conducción DL5 (Figura 69, 72) durante 120 segundos. Las válvulas V6 (Figura 69, 46), V7 (Figura 69, 45) y V8 (Figura 69, 47) se cierran y la DL5 (Figura 69, 72) se desactivó. Para liberar el ADN purificado que estaba unido al filtro de purificación, se pasan 300 microlitros de tampón de elución a través del filtro de purificación (Figura 69, 12). Opcionalmente, una parte del eluido puede dirigirse a un filtro para su almacenamiento como muestra de retención. En este caso, el filtro se incorporaría a un mecanismo que permitiría eliminarlo del biochip. *: 0,34 bares
- 25 • *Homogeneización*. El aire se conduce neumáticamente al interior de la cámara de retención de eluido abriendo las válvulas V6 (Figura 69, 46) y V8 (Figura 69, 47) y aplicando una presión de 34,47 kPa (5 psig)** a la línea de conducción DL4 (Figura 69, 71) durante 60 segundos. Las válvulas V6 (Figura 69, 46) y V8 (Figura 69, 47) se y la DL4 (Figura 69, 71) se desactiva. El aire que se conduce al interior de la cámara de retención de eluido burbujea a través del eluido para agitar y homogeneizar el ADN dentro del eluido.
- 30 • *Dosificación de eluido*. El eluido se conduce neumáticamente desde la cámara de retención de eluido (Figura 69, 25) al interior de las cámaras de dosificación de eluido (Figura 70, 8) abriendo la válvula V10 (Figura 69, 48) y aplicando una presión de 6,89 kPa (1 psig)* a la DL6 (Figura 69, 73) durante 40 segundos. La válvula V10 (Figura 69, 48) está cerrada y la DL6 (Figura 69, 73) está desactivada. Cada eluido llena la cámara de dosificación y se detiene en una membrana de ventilación. El exceso de eluido se conduce neumáticamente de nuevo al interior de la cámara de retención de eluido abriendo las válvulas V10 (Figura 69, 48) y V11 (Figura 70, 50) y aplicando una presión de 13,79 kPa (2 psig)** a la línea de conducción DL7 (Figura 70, 49) durante 25 segundos. Las válvulas V10 (Figura 69, 48) y V11 (Figura 70, 50) se cerraron y la DL7 (Figura 70, 49) se desactivó. *: 0,07 bares **: 0,34 bares
- 40 • *Reconstitución de la torta de PCR*. El eluido se conduce neumáticamente desde la cámara de dosificación de eluido (Figura 70, 8) al interior de la cámara de reconstitución y reciprocidad de la torta de PCR (Figura 70, 610) abriendo la válvula V11 (Figura 70, V11) y aumentando linealmente la presión de conducción de DL7 (Figuras 71, 49) de 0 a 103,4 kPa (0 a 15 psig)* durante 15 segundos. La cámara (Figura 70, 610) está diseñada para contener la torta de PCR liofilizada, permitir la reconstitución de la torta de PCR y la mezcla recíproca de la reacción de PCR. El volumen de la cámara es aproximadamente 2,2 veces el del eluido que se define por la cámara de dosificación de eluido (Figura 70, 8). La torta de PCR se coloca y se ubica en el lado de entrada de la cámara. La salida de la cámara está sellada por una válvula. El aire entre el eluido y la válvula V13 (Figura 71, 52) se comprime permitiendo que el eluido se desplace dentro de la cámara y entre en contacto con la torta de PCR liofilizada. Se permite que la torta se reconstituya manteniendo la presión de DL7 a 103,4 kPa (15 psig)* durante 60 segundos. Se transfieren 11,5 microlitros de eluido medido para reconstituir la torta que contiene la mezcla de reacción de PCR liofilizada para generar la mezcla de PCR para la amplificación. *: 1,03 bares **: 0,14 bares
- 55 • *Mezclar recíprocamente la disolución de PCR* - La disolución de PCR (es decir, la torta de PCR que se reconstituye con el eluido) se desplaza después de nuevo desde la cámara de reconstitución y reciprocidad de PCR (Figura 70, 10) a la cámara de dosificación de eluido (Figura 70, 8) disminuyendo linealmente la presión de la línea de conducción DL7 de 103,5 kPa a 0 kPa (15 psig* a 0 psig) durante 15 segundos. El aire entre el eluido y la válvula V13 (Figura 71, 52) se comprime y actúa como un resorte de aire para empujar contra la mezcla de PCR desplazándola hacia la cámara de dosificación (Figura 71, 8). La mezcla de PCR se mezcla recíprocamente aumentando linealmente la presión de conducción de DL7 de 0 kPa a 103,4 kPa (0 psig a 15 psig)* durante 15 segundos, y después de 103,4 kPa a 0 kPa (15 psig* a 0 psig) durante 15 segundos. La válvula V12 (Figura 70, 49) está cerrada y la línea de conducción DL7 (Figura 70, 49) está desactivada. *: 1,03 bares
- 65 • *Transferencia al interior de la cámara de termociclado*. La mezcla de reacción de PCR se conduce neumáticamente desde la cámara de dosificación de eluido (Figura 70, 8) al interior de las cámaras de

termociclado (Figura 70, 62) abriendo las válvulas V11 (Figura 70, 50), V13 (Figura 70, 52) y V14 (Figura 70, 53), y aplicando una secuencia de presión de conducción secuencialmente en aumento de 1,37 kPa (0,2 psig) durante 30 segundos, después de 2,74 kPa (0,4 psig) durante 30 segundos, después de 4,13 kPa (0,6 psig)* durante 30 segundos a la línea de conducción DL7 (Figuras 70, 49). Las válvulas V12 (Figura 70, 51) y V14 (Figura 70, 53) estaban cerradas y la DL7 (Figura 70, 49) estaba desactivada. La mezcla de reacción de PCR se transfiere al interior de las cámaras de termociclado y se detiene en la membrana de ventilación de la cola. *: 0,014 bares durante 30 segundos, luego 0,028 bares durante 30 segundos y luego 0,041 bares durante 30 segundos

• *Termociclado.* Para generar amplicones marcados, se aplica un protocolo de treinta y un ciclos para ciclar la reacción dentro de las cámaras de termociclado (Figura 70, 62). Las condiciones de ciclado son las siguientes: Arranque en caliente a 93 °C x 20 segundos seguido de 31 ciclos de (93 °C x 4 segundos, 56 °C x 15 segundos y 70 °C x 7 segundos) seguido de una extensión final de 70 °C x 90 segundos.

• *Dosificación del producto de PCR.* El producto de PCR se conduce neumáticamente desde las cámaras de termociclado (Figura 70, 62) a la cámara de dosificación de PCR (Figura 71, 74) abriendo las válvulas V11 (Figura 70, 50), V13 (Figura 70, 52) y V14 (Figura 70, 53), y V30 (Figura 71, 111), y aplicando una secuencia de presión de conducción secuencialmente en aumento de 1,37 kPa (0,2 psig) durante 30 segundos, después de 2,74 kPa (0,4 psig) durante 30 segundos, después de 4,13 kPa (0,6 psig) durante 45 segundos a la línea de conducción DL7 (Figura 70, 49)*. Las válvulas V11 (Figura 70, 50), V13 (Figura 70, 52), V14 (Figura 70, 53) y V30 (Figura 71, 111) se cerraron y la DL7 (Figura 70, 49) se desactiva. El producto de PCR fluye al interior de la cámara de dosificación y se detiene en una membrana de ventilación. *: 0,014 bares durante 30 segundos, después 0,028 bares durante 30 segundos y después 0,041 bares durante 45 segundos

• *Dosificación de formamida.* La formamida se conduce neumáticamente desde la cámara de reactivo de formamida (Figura 71, 60) al interior de la cámara de dosificación de formamida (Figura 71, 76) aplicando una presión de 6,89 kPa (1 psig)** durante 50 segundos a la línea de conducción DL8 (Figuras 71, 75). La línea de conducción DL8 (Figuras 71, 75) está desactivada. En este etapa, un 6° del volumen de formamida (Figura 71, 77) se mide para reconstituir una torta para generar una muestra de control. La formamida fluye al interior de la cámara de dosificación y se detiene en una membrana de ventilación. El exceso de formamida se conduce neumáticamente desde la cámara de formamida al interior de una cámara de residuos abriendo la válvula V15 (Figura 71, 54) y aplicando una presión de 20,68 kPa (3 psig) durante 180 segundos a la línea de conducción DL8 (Figuras 71, 75). La válvula V15 (Figura 71, 54) está cerrada y DL8 (Figura 71, 75) está desactivada. Todo el exceso de la cámara de reactivo de formamida y de la línea de conducción se transfiere a la cámara de residuos. *: 0,21 bares **: 0,07 bares

• *Unión del producto de PCR y formamida.* El producto de PCR medido se conduce neumáticamente desde la cámara de dosificación de PCR (Figura 71, 74) al interior de la cámara de unión (Figura 71, 78) abriendo la válvula V18 (Figura 71, 57), V17 (Figura 71, 80) y V20 (Figura 71, 81) y aplicando un perfil de conducción de 4 etapas de 1,37, 2,06, 2,75 y 3,44 kPa (0,2, 0,3 0,4 y 0,5 psig) durante 30, 30, 30 y 30 segundos, respectivamente, a la línea de conducción DL9 (Figuras 71, 79). Las válvulas V18 (Figura 71, 57), V17 (Figura 71, 80) y V20 (Figura 71, 81) se cerraron y la DL9 (Figura 71, 79) se desactivó. La formamida medida se condujo neumáticamente desde la cámara de dosificación de formamida (Figuras 71, 76) al interior de la cámara de unión (Figura 71, 78) mediante V20 (Figura 71, 81) aplicando una presión en aumento de 1,37, 2,75 y 4,13 kPa (0,2, 0,4 y 0,6 psig) durante 30, 30 y 60 segundos a la línea de conducción DL8 (Figuras 71, 75). La válvula V20 (Figura 71, 81) está cerrada y DL8 (Figura 71, 75) está desactivada. La cámara de unión permite que el producto de PCR medido como la formamida medida, que se originan a partir de dos flujos independientes, se combinen para formar la muestra para la separación y detección. *: 0,014, 0,021, 0,028 y 0,034 bares; **: 0,014, 0,028 y 0,041 bares

• *Reconstitución de la torta de ILS.* Para la separación y detección, la muestra se conduce neumáticamente desde la cámara de unión (Figura 71, 78) al interior de las cámaras de torta de ILS (Figura 71, 635) y la cámara de torta de ILS + Control (Figura 71, 682) abriendo las válvulas V20 (Figura 71, 81) y aumentando linealmente la presión de conducción de DL8 (Figura 71, 75) de 0 a 103,4 kPa (0 a 15 psig)* durante 15 segundos. El aire entre la muestra y la válvula V21 (Figura 71, 86) se comprime permitiendo que la muestra se desplace al interior de la cámara y entre en contacto con la torta de ILS liofilizada. Se permite que la torta se reconstituya manteniendo la presión de DL8 (Figura 71, 75) a 103,4 kPa (15 psig)* durante 60 segundos. Se transfieren 11,5 microlitros de muestra medida para reconstituir la torta que contiene el patrón de carril interno liofilizado para generar la muestra de separación y detección. *: 1,03 bares

• *Mezclar recíprocamente la disolución de separación y detección* - La disolución de PCR (es decir, la torta de ILS que se reconstituye con la formamida medida y el producto de PCR medido) se desplaza después de nuevo desde la cámara de reconstitución y reciprocidad de ILS (Figuras 71, 635) a la cámara de unión (Figura 71, 78) disminuyendo linealmente la presión de la línea de conducción DL8 (Figura 71, 75) de 103,5 kPa a 0 kPa (15 psig a 0 psig)* durante 15 segundos. El aire entre el eluido y la válvula V13 (Figura 71, 52) se comprime y actuará como un resorte de aire para empujar contra la muestra de separación y detección para mezclar

moviéndolo hacia la cámara de dosificación de formamida (Figura 71, 76). La muestra de separación y detección se mezcla recíprocamente aumentando linealmente la presión de conducción de DL8 (Figura 71, 75) de 0 kPa a 103,4 kPa (0 psig a 15 psig)* durante 15 segundos, y después de 103,4 kPa a 0 kPa (15 psig a 0 psig)* durante 15 segundos. La línea de conducción DL8 (Figura 71, 75) se desactivó. *: 1,03 bares

- *Inyección de muestras en el canal de separación.* Las 5 muestras de separación y detección se conducen neumáticamente desde la cámara de unión (Figura 71, 78) y la muestra de control desde la cámara de dosificación de formamida (Figura 71, 76) a través de la cámara de torta de ILS (Figura 71, 635 y 682), que ahora actúa como una cámara de eliminación de burbujas para llenar la cámara de cátodo (Figura 71, 84) y una cámara de residuos de muestra (Figura 71, 85) abriendo las válvulas V21 (Figura 71, 86) y V22 (Figura 71, 87) y aplicando una presión a la línea de conducción DL9 (Figura 71, 79) con un perfil secuencialmente escalonado de 2,75, 4,13, 6,89, 10,34 y 13,79 kPa (0,4, 0,6, 1,0, 1,5 y 2,0 psig)* durante 30, 30, 30, 30 y 30 segundos, respectivamente. Las válvulas V21 (Figura 71, 86) y V22 (Figura 71, 87) están cerradas y la DL8 (Figura 71, 74) está desactivada. El ADN dentro de la muestra se inyecta desde la cámara de cátodo (Figura 71, 84) al interior de la parte de separación del biochip (Figura 55 y Figura 56, 88), aplicando una tensión de 4.400 V para polarizar el cátodo (Figura 55 y 56, 63) y el ánodo (Figura 55 y 56, 64) durante 35 segundos. *: 0,028, 0,041, 0,069, 0,103 y 0,138 bares
- *Separación y detección de ADN.* El TTE se conduce neumáticamente desde el depósito de reactivo TTE (Figura 71, 59) para llenar el cátodo (Figura 71, 84) y para llenar las cámaras de residuos de TTE (Figura 71, 92, 93 y 13) abriendo las válvulas V25 (Figura 71, 91), V24 (Figura 71, 90), V26 (Figura 71, 95), V27 (Figura 71, 96) y V28 (Figura 71, 97) y aplicando una presión a la línea de conducción DL10 (Figura 71,98) de 13,79 kPa (2 psig)* durante 240 segundos. Las válvulas V25 (Figura 71, 91), V24 (Figura 71, 90), V26 (Figura 71, 95), V27 (Figura 71, 96) y V28 (Figura 71, 97) se cerraron y la DL10 (Figura 71, 98) se desactiva. El flujo de TTE a través de los cátodos desplaza la muestra dentro de los cátodos. El ADN que se inyecta en la parte de separación del biochip S&D (Figura 55) se desplazó inyectado por la parte de separación del biochip, cuando se aplican 6.400 V para polarizar el cátodo (Figura 55 y 56, 63) y el ánodo (Figura 55 y 56, 64) durante 30 minutos. El sistema óptico también se activa para efectuar la excitación y detección de fluorescencia inducida por láser en la ventana de excitación y detección. El láser se ajusta a 200 mW y se implementa una velocidad de recogida de datos de 5 Hz. La señal fluorescente se desplaza a través de la trayectoria de detección a los tubos fotomultiplicadores. Allí, la fluorescencia se convirtió en una señal que registra por el software del sistema. *: 0,138 bares

Se generaron electroferogramas para las muestras y el control siguiendo las etapas de proceso programadas como se indicó anteriormente. El proceso completo desde la inserción de las muestras hasta la generación del electroferograma requiere aproximadamente 90 minutos. Se pueden acortar muchas etapas de proceso, y si se desea, el proceso se puede realizar en menos de 45 minutos.

La Figura 77 ilustra la relación de las etapas de procesamiento programadas y las etapas de procesamiento resultantes para una parte del proceso. El eluido se conduce neumáticamente desde la cámara de retención de eluido (Figura 39, 25) para dar como resultado un volumen medido al interior de las cámaras de dosificación de eluido (Figura 39, 8) con el programa de 10 etapas de la Figura 77. Las etapas del programa consisten en 5 cambios de estado de la válvula y la línea de transmisión para desplazar eluidos desde las cámaras de retención a las cámaras de dosificación. Las 5 etapas siguientes del programa eliminan el exceso de eluido y empujan este volumen al interior de la cámara de retención. Por consiguiente, las 10 etapas de procesamiento programadas (presiones en aumento y disminución en válvulas y líneas de conducción) corresponden a dos etapas de procesamiento resultantes (el movimiento de la muestra desde la cámara de retención de eluido a la cámara de dosificación de eluido y el movimiento del exceso de muestra de nuevo a la cámara de retención de eluido).

Ejemplo 7. División de muestras para eliminar la necesidad de cuantificar el ácido nucleico

La cantidad de ácidos nucleicos en una muestra dada, ya sea una muestra forense, clínica o de amenaza biológica, es muy variable. En determinadas manipulaciones de ácido nucleico, las condiciones de reacción requieren un intervalo particular de ácido nucleico de entrada para ser eficaces. En el laboratorio, este problema se resuelve frecuentemente realizando una etapa de cuantificación de ácido nucleico antes de una manipulación dada. La cuantificación de ácido nucleico se ha desarrollado para aplicaciones microfluídicas como se describe en la solicitud de patente N.º de serie 12/816.370 titulada "Improved Methods for Forensic DNA Quantitation".

La presente invención proporciona otra disolución al problema de requerir un determinado intervalo de ácidos nucleicos en un biochip microfluídico. Este enfoque no implica la cuantificación, sino que se basa en diluir una muestra dada una o más veces para proporcionar 2 o más concentraciones de ácido nucleico para su análisis, preferentemente en paralelo. La invención se ejemplifica usando muestras de contacto. Las muestras de contacto son muestras forenses que consisten en células (principalmente epiteliales) que quedan sobre las superficies después de la exposición al cuerpo humano. Incluyen huellas digitales, células cutáneas que se encuentran en la ropa (por ejemplo, en el cuello de una camisa) y células epiteliales orales que se encuentran en la abertura de una lata de refresco o en el borde de un vaso. La cantidad de ADN que se recupera de las muestras de ADN de contacto es muy variable. Las muestras de contacto contienen generalmente hasta 100 ng de ADN, y la mayoría de las

muestras de contacto contienen de 0,5 - 10 ng de ADN. Por consiguiente, el sistema de muestras de contacto procesará hisopos que contengan 0,5 - 100 ng de ADN.

Aunque es probable que la mayor parte de las muestras de contacto contengan menos de 10 ng de ADN, una muestra de contacto desconocida debe procesarse con la esperanza de que todo el intervalo de 200 veces de ADN debe procesarse correctamente. En un sistema de amplificación manual, amplificar 0,5 ng sería razonable, pero amplificar 100 ng no lo sería. Por consiguiente, en sistemas manuales, el ADN purificado de muestras de contacto se cuantifica generalmente antes de la amplificación. Los biochips microfluídicos de la invención permiten que el ADN de la muestra de contacto se procese sin cuantificación dividiendo el ADN purificado en dos alícuotas dentro del subconjunto fluido. Una alícuota del ADN eluido se amplifica pura (suponiendo que en la mezcla de amplificación esté presente menos de 10 ng de ADN) y la otra se diluye 20 veces (suponiendo que en la mezcla de reacción esté presente 5 - 100 ng de ADN). Las alícuotas tanto puras como diluidas se amplifican y se separan y se detectan independientemente pero en paralelo. La muestra pura permite una amplificación eficaz en un intervalo de al menos 0,05 - 10 ng de ADN purificado, y la muestra diluida permite una amplificación eficaz en un intervalo de al menos 1 - 200 ng de ADN purificado; todo el intervalo de contenido de ADN que se puede analizar eficazmente se amplía sobre un intervalo de al menos 40.000 veces.

Las microfluídicas de separación de muestras se incorporan en los biochips de los Ejemplos 5 y 6 de la siguiente manera. El ADN se eluye en un volumen de 20 microlitros usando el mismo protocolo de purificación de ADN. En este volumen, la cámara de retención de eluido se retira del subsistema de procesamiento macrofluídico, y en la placa fluidica del subconjunto fluido se coloca una cámara de contención de eluido de 20 microlitros. En esa placa, los 20 microlitros de ADN purificado se dirigen en trayectorias paralelas:

- En la trayectoria pura, se dosifican 12 microlitros de ADN en una cámara de dosificación, se transfieren a la cámara de reconstitución de la torta de PCR y se transfieren a las cámaras de PCR para la amplificación. Las cámaras se ampliarán ligeramente para admitir aproximadamente 10 microlitros de mezcla de reacción reconstituida.
- En la trayectoria de dilución, se dosifican aproximadamente 2 microlitros de ADN y se unen con 38 µl de disolución de elución medida. La disolución diluida se transfiere después a la cámara de reconstitución de la torta y se transfiere a las cámaras de PCR para la amplificación.
- Después de la amplificación, las dos soluciones se procesan en paralelo mediante separación y detección.

En la Figura 78 se muestra un diagrama de flujo del circuito microfluídico de división y dilución de la muestra. Opcionalmente, la muestra de ADN purificada se puede dividir en más de dos alícuotas para el procesamiento posterior, y la muestra diluida se puede diluir aún más para generar alícuotas adicionales para el procesamiento. Para muestras de contacto, dicha dilución no es necesaria, aunque determinadas muestras forenses, de diagnóstico clínico y de amenaza biológica pueden contener mucho más ADN y su análisis se ve facilitado por el procesamiento de tres o más alícuotas.

Ejemplo 8. Fluorescencia de fondo en plástico

Los biochips de separación y detección están fabricados con material termoplástico. Cuando los polímeros termoplásticos se exponen a autofluorescencia de excitación por láser generan un ruido de fondo que el sistema de detección detecta y procesa. Esta autofluorescencia degrada la relación de la señal con respecto al ruido de los picos de señal reales, lo que eleva el límite de detección del sistema. Para la separación y detección, los biochips S&D convencionales se fabrican en sustratos de vidrio o cuarzo que, en comparación con los sustratos de plástico, presentan menos autofluorescencia por unidad de espesor. Se deben tener en cuenta varias cuestiones al realizar la detección de fluorescencia inducida por láser en sustratos de plástico:

- (1) Seleccionar un material plástico que presente baja autofluorescencia - Para fabricar los biochips de separación y detección que se usan en los Ejemplos 5 y 6, se usó material termoplástico de copolímero olefínico cíclico (COC) y polímero olefínico cíclico (COP). En comparación con otros polímeros, estos materiales termoplásticos presentan autofluorescencia intrínsecamente más baja en el intervalo de longitud de onda visible.
- (2) Reducir el espesor del sustrato de plástico que es excitado por el láser - El espesor del material usado está limitado por la capacidad de la estructura para soportar las presiones de llenado de gel que pueden superar los 2.423 kPa (350 psig)*. Los biochips usados en los Ejemplos 5 y 6 se fabrican estampando características de canal en una lámina termoplástica de 188 micras de espesor y después uniendo otra lámina termoplástica de 188 micras de espesor para cubrir los canales. Se realizó un experimento para medir la fluorescencia de fondo en sustratos de vidrio y plástico colocando varios sustratos (plástico 188 nm, plástico 376 nm, vidrio de borosilicato 0,7 nm y vidrio de borosilicato 1,4 nm) en la ventana de separación y detección del instrumento de detección óptica Genebench (véase, en líneas generales, la solicitud N.º de serie 12/080.745, publicada como 2009/0020427 titulada "Plastic Microfluidic Separation and Detection Platforms"). Se aplicaron 200 mW de excitación láser al sustrato y se recogió la señal. La Figura 79 muestra la fluorescencia de fondo de plástico de

baja fluorescencia (188 micras y 376 micras de espesor) y vidrio de borosilicato (0,7 mm y 1,4 mm de espesor). Los datos muestran que la fluorescencia de fondo para las películas finas de plástico es 4 a 7 veces menor que la del vidrio de borosilicato de 0,7 mm y 1,4 mm de espesor. *: 24,1 bares

- 5 (3) Incorporación de un filtro para reducir la emisión de fondo - Aunque la fluorescencia de fondo es baja en general, el plástico presenta una alta autofluorescencia a aproximadamente 569 nm. Este pico de emisión es el resultado de la fluorescencia Raman que se genera cuando el plástico es excitado por un láser de 488 nm. El espectro del pico muestra que está centrado a aproximadamente 569 nm y que tiene una anchura completa de 5 nm. La fluorescencia Raman puede eliminarse usando un filtro de ranura con una longitud de onda central de aproximadamente 570 nm y una banda de rechazo entre aproximadamente 5 y 10 nm. Se realizó un experimento para evaluar la mejora de la señal frente al ruido usando un filtro de ranura para eliminar la fluorescencia Raman del plástico. Se realizó un conjunto de 3 ejecuciones de separación y detección sin un filtro de ranura y otro conjunto se realizó con un filtro de ranura instalado en la entrada de la caja PMT. En la Figura 80 se resumen los resultados de los datos. Los datos muestran que el filtro reduce el ruido entre picos en el canal amarillo de 67 a 39 unidades relativas de fluorescencia (urf). El filtro también reduce las intensidades de señal absolutas de 1520 a 1236 urf, con una mejora general de la relación entre la señal y el ruido de 23 a 32. Un filtro de ranura es útil en los sistemas ópticos de los instrumentos tanto integrados como no integrados en entornos donde el límite de detección es particularmente importante (por ejemplo, para el análisis de muestras forenses de contacto y el diagnóstico precoz de agentes infecciosos en el transcurso de una enfermedad dada cuando el número de organismos patógenos es bajo).

25 **Ejemplo 9 Diseño de un biochip completamente integrado que purifica ácidos nucleicos a partir de muestras clínicas de sangre completa, amplifica el ADN purificado, secuenciar mediante Sanger el ADN amplificado, ultrafiltra el ADN secuenciado y separa electroforéticamente el ADN ultrafiltrado y genera una secuencia de ADN multiplexada mediante un programa automatizado.**

30 En los componentes extracelulares de la sangre pueden estar presentes patógenos, tales como estafilococos, estreptococos y *Yersinia enterocolitica*. Un biochip de plástico, unitario, estacionario, que acepta 2 muestras de sangre y que genera una secuencia de ADN a partir de 8 locus de un patógeno dado consiste en una pila neumática-válvula-fluídica, un subconjunto de procesamiento macrofluídico y un subconjunto de separación y detección. El biochip se parece al biochip moldeado por inyección del Ejemplo 6 con las modificaciones que se describen a continuación, y basándose en un programa automatizado, el proceso se realiza de la siguiente manera:

35 El subconjunto macrofluídico está compuesto por 12 cámaras que contienen reactivos precargados o sirven como cámaras de retención/reacción durante el proceso de purificación de ADN. Para aceptar el tubo de recogida de sangre se usa una cámara; seis cámaras se llenan previamente con 3 ml de disolución de lavado, 100 microlitros de disolución de resuspensión celular, 450 microlitros de disolución de lisis, 550 microlitros de etanol absoluto, 2 microlitros de tampón de lavado, 2000 microlitros de agua desionizada y 400 microlitros de tampón de elución.

40 El conjunto de biochip acepta un tubo Vacutainer estándar de 3 cm³ (para experimentos de separación, la sangre se recoge en tubos que contienen anticoagulantes apropiados). El tubo de recogida de sangre se inserta en el biochip con el tapón de goma hacia abajo. El proceso de purificación comienza cuando el usuario pulsa un botón de inicio en el instrumento. Dentro del instrumento, el tubo de recogida de sangre se empuja sobre dos pernos huecos ubicados en la base de la cavidad del tubo de recogida de sangre. Los pernos huecos perforan el tapón de goma y el tubo de recogida de sangre se presuriza neumáticamente a 34,47 kPa (5 psi*) para extraer la sangre desde el tubo de recogida de sangre a través de un filtro con un tamaño de poro nominal de 8 micras (tal como los medios Leukosorb B, Pall Corporation, Port Washington, NY) para eliminar los leucocitos de la sangre. El flujo de paso se hace pasar a través de una sola capa de membrana grabada con pistas de policarbonato de 0,2 micras (SPI-Pore™ Track-Etch Membrane, Structure Probe, Inc., West Chester, PA) para concentrar las bacterias a través de la captura en la membrana, y este flujo de paso se dirige a una cámara de residuos. *: 0,34 bares

55 A la superficie de la membrana grabada con pistas se la aplica una disolución de resuspensión (100 microlitros), resuspendiendo los patógenos retenidos en la membrana grabada con pistas y generando una suspensión concentrada de patógenos (que también puede incluir leucocitos residuales). Esta suspensión se conduce neumáticamente a la cámara de lisis. La purificación de ADN se realiza como se describe en los Ejemplos 5 y 6, con todos los volúmenes proporcionalmente más bajos. El reactivo de lisis caotrópica se conduce al interior de la cámara de lisis, y el aire se conduce neumáticamente a la cámara de lisis/residuos para producir el burbujeo caótico del lisado. El etanol del depósito de etanol se conduce a la cámara de lisis/residuos y se mezcla mediante burbujeo caótico. La mezcla de lisado/etanol se conduce neumáticamente al interior de la cámara de retención y a través de la membrana de purificación y al interior de la cámara de lisis/residuos. La membrana se somete a una serie de tres lavados, eliminando el material no unido y la disolución de lisis residual. El filtro se seca al aire. 20,5 microlitros de disolución de elución se conducen neumáticamente desde el depósito de la disolución de elución a través de la membrana de purificación hasta la cámara de retención de eluido. Este volumen más pequeño garantiza que una gran proporción de los ácidos nucleicos aislados se amplifiquen en la reacción de amplificación posterior.

65

El eluido se conduce neumáticamente desde la cámara de retención de eluido al interior de las cámaras de dosificación de eluido, y el exceso de eluido se conduce neumáticamente de nuevo al interior de la cámara de retención de eluido. El eluido se conduce neumáticamente desde la cámara de dosificación de eluido a la cámara de la torta de PCR. Para generar la mezcla de PCR para la amplificación, se transfieren 20,5 microlitros de eluido medido para reconstituir la torta que contiene la mezcla de reacción de PCR liofilizada. La torta contiene los mismos componentes que los de las Figuras 5 y 6, con la excepción de que los pares de cebadores de STR humanos (uno de cada par está marcado con fluorescencia) se reemplazan por un conjunto de 80 pares de cebadores (ninguno de los miembros de cada par está marcado). Los 80 pares de cebadores representan 8 locus específicos para cada uno de los 10 patógenos, incluyendo estafilococos, estreptococos y *Yersinia enterocolitica* (si se desea, son posibles conjuntos mucho más grandes de locus). La mezcla de reacción de PCR reconstituida se conduce neumáticamente desde las cámaras de la torta al interior de las cámaras de termociclado y se detiene en la membrana de ventilación de la cola. Se aplica un protocolo de amplificación de treinta y un ciclos para ciclar la reacción dentro de la cámara de termociclado. Todas las etapas programadas y del proceso se realizan esencialmente como se describe en los Ejemplos 5 y 6.

El producto de PCR se conduce neumáticamente desde las cámaras de termociclado al interior de la cámara de dosificación de PCR y se detiene en una membrana de ventilación. Seis microlitros del producto de PCR se mezclan con 94 microlitros de agua desionizada en una cámara de unión. La cámara de unión permite que tanto el producto de PCR medido como el agua medida (que se originan a partir de dos flujos independientes) se combinen para formar la muestra para la reconstitución de la torta de secuenciación liofilizada. El producto de PCR diluido se conduce desde la cámara de unión y se divide en 8 cámaras de dosificación, cada una de las cuales contiene 11 microlitros y está en la cola gracias a una membrana de ventilación. Cada una de las ocho muestras se conduce a una cámara de reconstitución de torta de secuenciación. Las ocho tortas son versiones ligeramente diferentes de la mezcla de reacción de Sanger (basada en el uso de terminadores marcados con colorantes, de modo que cada producto de extensión lleve una sola etiqueta fluorescente correspondiente a la base en esa posición de la secuencia), conteniendo cada torta un solo conjunto de diez cebadores de secuenciación - uno para un locus para cada uno de los diez patógenos de interés. Para un organismo patógeno dado, un par de cebadores para un locus específico está en la torta uno, un segundo en la torta dos, etc.; esta colocación garantiza que se genere una sola secuencia de ADN para un patógeno dado a partir de cada torta. Las mezclas de reacción de secuenciación reconstituidas se conducen neumáticamente desde las cámaras de la torta al interior de las cámaras de ciclado de secuencia de ciclo (ubicadas justo por encima del segundo termociclador) y se detienen en la membrana de ventilación de la cola; cada cámara de ciclado contiene 10 microlitros. La secuenciación cíclica se realiza de la siguiente manera: 95 °C durante 15 segundos seguido de 30 ciclos de [95 °C durante 5 segundos, 50 °C durante 10 segundos y 60 °C durante 25 segundos). Para cada una de las ocho reacciones de secuenciación (ahora un total de 16 para dos muestras de sangre), los 10 microlitros del producto de reacción de secuenciación se mezclan con 100 microlitros de agua desionizada en una cámara de unión en preparación para la ultrafiltración.

El rendimiento de la separación electroforética se puede mejorar en gran medida mediante la purificación del producto de secuenciación para eliminar los iones necesarios para la secuenciación (y la reacción de PCR anterior) que interfieren con la separación. Se puede emplear una variedad de métodos, incluyendo ultrafiltración, ya que los iones pequeños/cebadores/marcadores colorantes no incorporados son conducidos a través de un filtro, dejando el producto deseado en el filtro que después se puede eluir y aplicar directamente para la separación y detección. Los medios de ultrafiltración incluyen filtros de poliétersulfona y celulosa regenerada "tejida", así como membranas grabadas con pistas, en donde se forman poros de tamaño muy uniforme en una membrana extremadamente fina (1-10 µm). Estas últimas tienen la ventaja de recoger productos de mayor tamaño que el tamaño de poro en la superficie del filtro, en lugar de capturar el producto a cierta profundidad debajo de la superficie.

Por consiguiente, el producto de secuenciación diluido se condujo a través de un filtro de ultrafiltración. El filtro atrapa el producto de secuenciación de Sanger pero permite que los iones y los tampones de secuenciación diluidos pasen a su través. El material en el filtro se lavó conduciendo neumáticamente 200 µl de agua desionizada a través del filtro para eliminar adicionalmente iones y tampón. Finalmente, el producto de secuenciación de Sanger limpio se eluyó del filtro conduciendo neumáticamente 10 µl de agua desionizada al interior de la cámara de filtro para resuspender el producto de secuenciación de Sanger. Después, el eluido se conduce neumáticamente al interior de la cámara de unión. La formamida se conduce neumáticamente desde la cámara de reactivo de formamida al interior de la cámara de dosificación de formamida. La formamida fluye al interior de la cámara de dosificación y se detiene en una membrana de ventilación. El exceso de formamida se conduce neumáticamente desde la cámara de formamida al interior de una cámara de residuos. Diez microlitros de producto ultrafiltrado dosificado se conducen neumáticamente desde la cámara de dosificación al interior de la cámara de unión. La formamida medida se condujo neumáticamente desde la cámara de dosificación de formamida al interior de la cámara de unión. La cámara de unión permite que el producto ultrafiltrado medido y la formamida medida (que se originan a partir de dos flujos independientes) se combinen para formar la muestra para la separación y detección. La electroforesis se realiza como se describe en los Ejemplos 5 y 6, con la excepción de que el biochip se calienta a 60 °C. Las tensiones y los tiempos de inyección, y las tensiones y tiempos de separación, son idénticos a los de los Ejemplos 5 y 6. Las dos muestras de sangre se procesan de manera que generan 16 canales de producto para la separación y detección. En general, el número de canales de separación por muestra es equivalente al mayor número de locus y de pares de cebadores que se interrogan para uno de los patógenos que se está evaluando.

El sistema óptico se activa para efectuar la excitación y detección de fluorescencia inducida por láser. El láser se ajusta a 200 mW y se implementa una velocidad de recogida de datos de 5 Hz. Después de la corrección de color, un identificador automático de bases genera secuencias a partir de carriles que contienen uno de los diez patógenos para los cuales se incorporaron cebadores de amplificación y secuenciación en las tortas de amplificación y secuenciación, respectivamente. Se generan aproximadamente 500 pb de secuencia por carril.

El biochip se puede modificar de muchas maneras, basándose en el tipo de muestra clínica y de los patógenos a identificar. Por ejemplo, determinadas bacterias, tales como *Francisella tularensis* y *Chlamydia trachomatis*, pasan una parte significativa de sus ciclos vitales dentro de las células de mamíferos. Algunos son organismos intracelulares obligados y otros son opcionalmente intracelulares. El proceso de purificación de ADN para dichas bacterias intracelulares en sangre es similar al descrito anteriormente con una gran excepción. Después de la aplicación de sangre completa en y a través del filtro de separación celular, los leucocitos atrapados por el filtro contienen el ADN de interés. El filtro se lava, se resuspende en 100 microlitros y se somete a purificación basada en guanidinio como se describe en el Ejemplo I con la reducción correspondiente en el volumen de reactivo.

Si se desea, el aparato se puede diseñar para lisar inicialmente los leucocitos (osmóticamente, por ejemplo), aprovechando la relativa facilidad de la lisis de las células de mamíferos en comparación con las bacterias. En esta configuración, las bacterias intracelulares intactas se liberan, y el extracto celular se pasa a través de un filtro de captura de bacterias y se lava. Después, el ADN bacteriano se purifica como se describe anteriormente. Similarmente, la sangre completa se puede lisar en ausencia de separación celular, permitiendo que se purifique el ADN bacteriano o vírico extracelular o intracelular.

REIVINDICACIONES

1. Un biochip que comprende una cubierta superior con líneas de conducción neumáticas y:
 - 5 una cámara de almacenamiento de reactivo (102) precargada que tiene un extremo superior y un extremo inferior; un primer sello de lámina (101) unido al extremo inferior; un segundo sello de lámina (101) unido al extremo superior;
 - 10 en donde un reactivo se almacena en la cámara sellada con lámina y se libera por la aplicación de una presión neumática de 137,9 – 3447,3 kPa a través de la cubierta, de tal manera que estallan las láminas superior e inferior, liberando el contenido de la cámara de almacenamiento de reactivo.
2. El biochip de la reivindicación 1, en donde uno o los dos sellos de lámina están ranurados.
- 15 3. El biochip de la reivindicación 2 conectado a un subconjunto fluídico.
4. El biochip de la reivindicación 3, que comprende además proporcionar una placa espaciadora colocada entre el recipiente y el subconjunto fluídico, de tal manera que la placa espaciadora tiene un tamaño que admite la expansión de la primera lámina antes de estallar.
- 20 5. El biochip de la reivindicación 1, en donde la cámara de almacenamiento de reactivo contiene al menos un tubo de reactivo sellado precargado.
6. El biochip de la reivindicación 1, en donde la cámara de almacenamiento de reactivo es un tubo de estructura tubular.
- 25 7. El biochip de la reivindicación 1, en donde la cámara de almacenamiento de reactivo es una estructura de un solo tubo.
8. Un instrumento que comprende un subsistema neumático que aplica presión para hacer estallar láminas y un biochip de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7.
- 30 9. Un recipiente de almacenamiento de reactivo para un biochip, comprendiendo el recipiente de almacenamiento de reactivo un bloque macrofluídico y una cubierta con líneas de conducción neumáticas, comprendiendo el bloque macrofluídico:
 - 35 una cámara de almacenamiento de reactivo que tiene un extremo superior y un extremo inferior; un primer sello de lámina unido al extremo inferior; un segundo sello de lámina unido al extremo superior;
 - 40 en donde un reactivo se almacena en la cámara de almacenamiento de reactivo sellada con lámina y se libera por la aplicación de una presión neumática de 137,9 – 3447,3 kPa a través de la cubierta superior, de tal manera que estallan las láminas superior e inferior, liberando el contenido de la cámara de almacenamiento de reactivo.
- 45 10. El recipiente de la reivindicación 9, en donde uno o los dos sellos de lámina están ranurados.
11. El recipiente de la reivindicación 10 conectado a un subconjunto fluídico.
12. El recipiente de la reivindicación 11, que comprende además proporcionar una placa espaciadora colocada entre el recipiente y el subconjunto fluídico, de tal manera que la placa espaciadora tiene un tamaño que admite la expansión de la primera lámina antes de estallar.
- 50

Figura 1

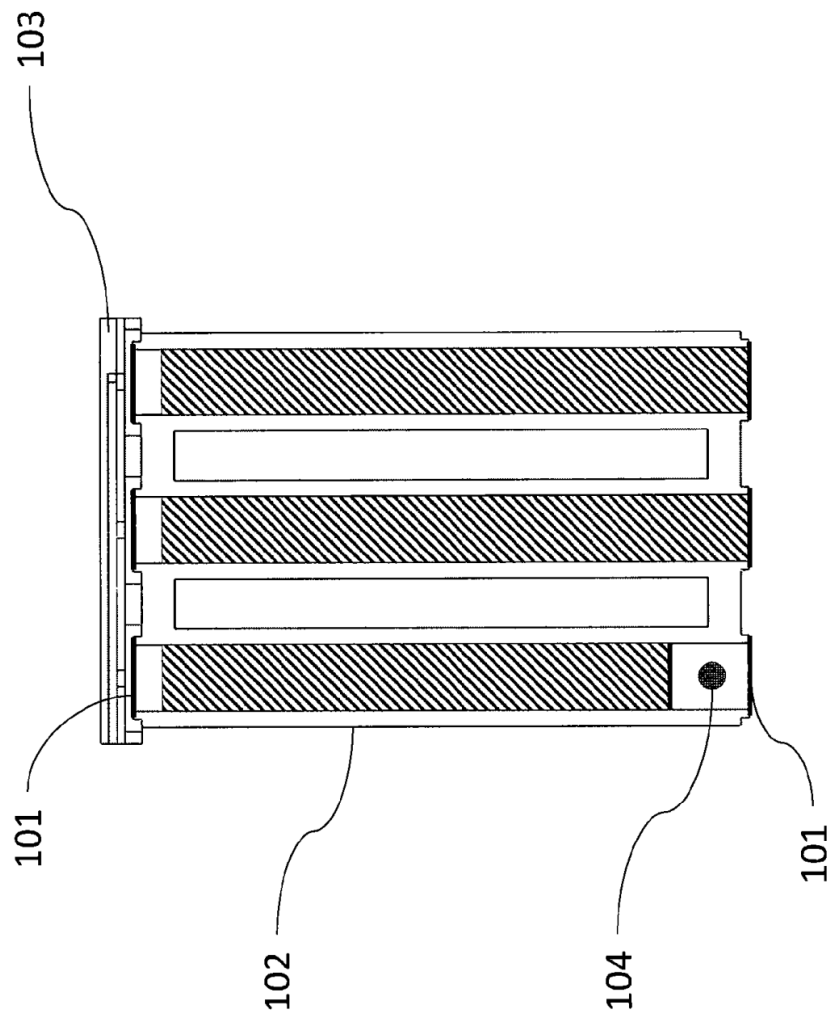


Figura 2

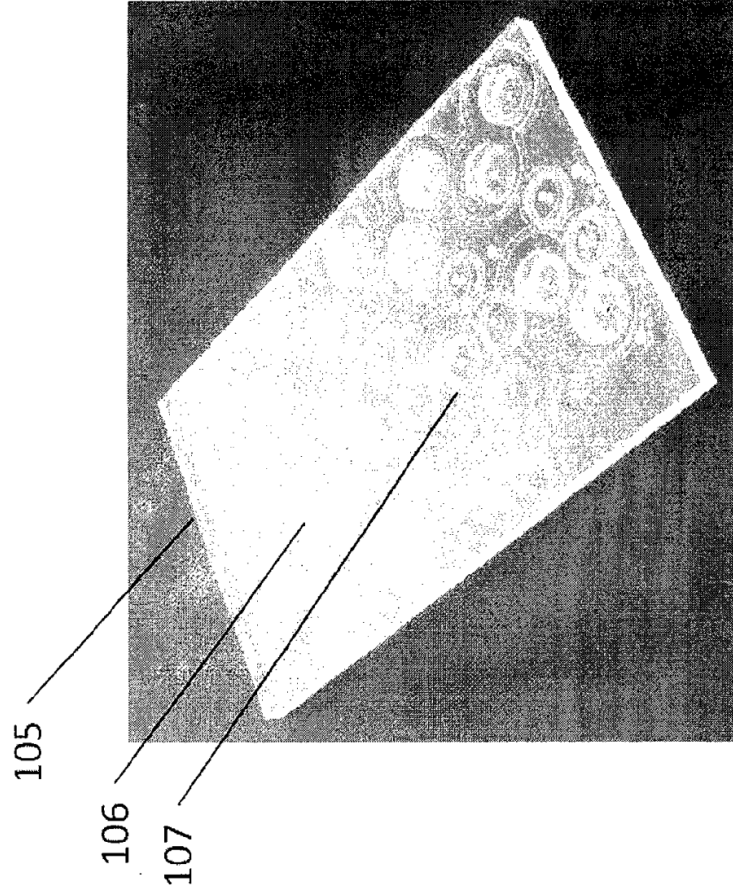


Figura 3

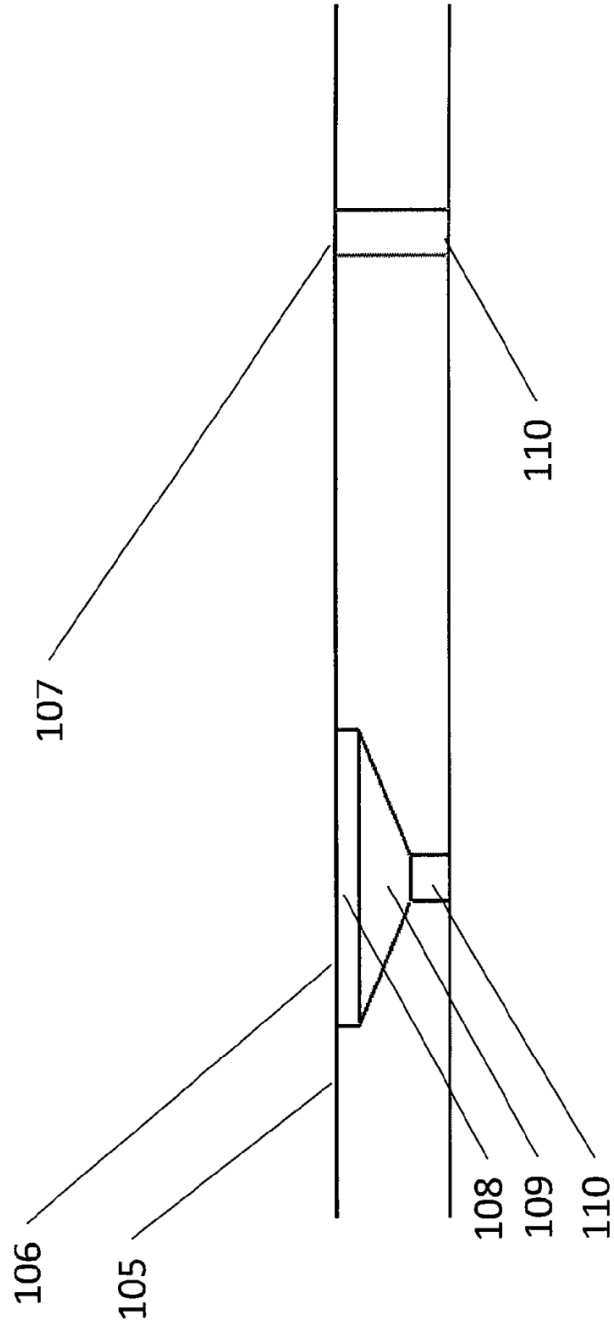


Figura 4

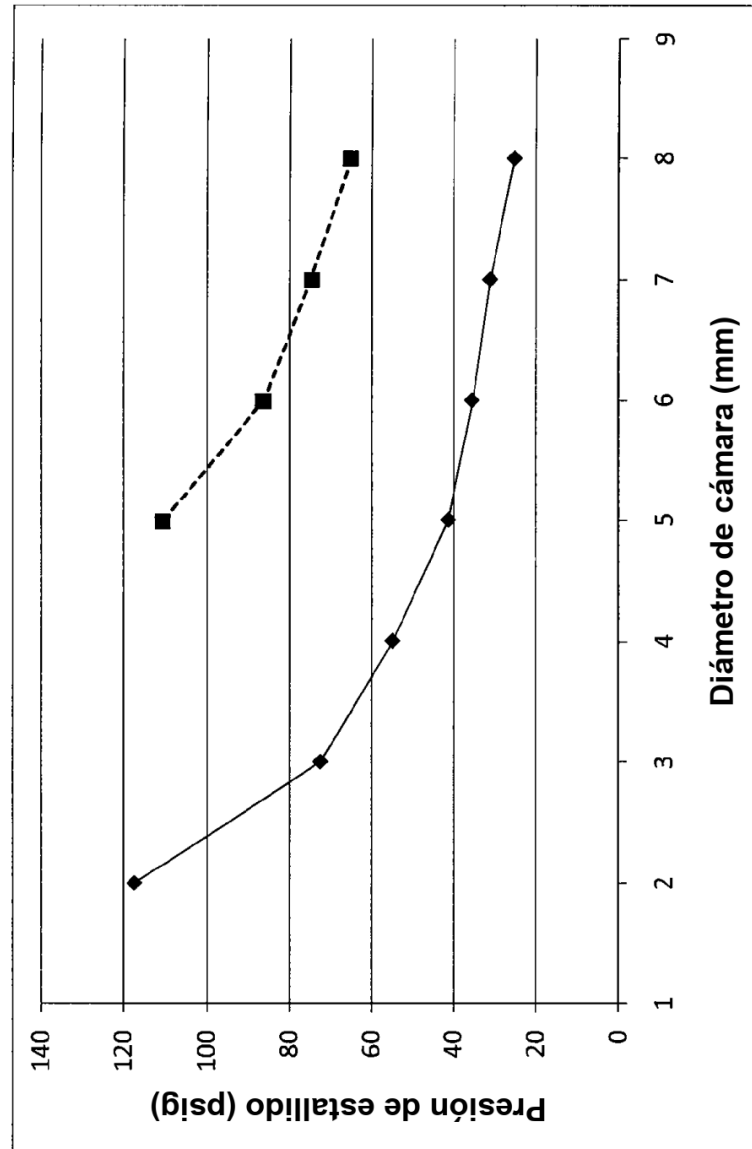


Figura 5

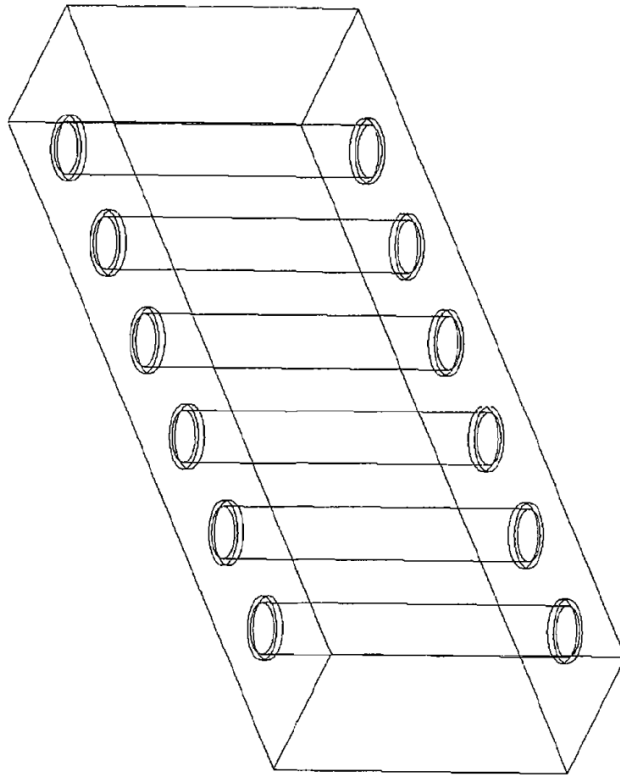


Figura 6

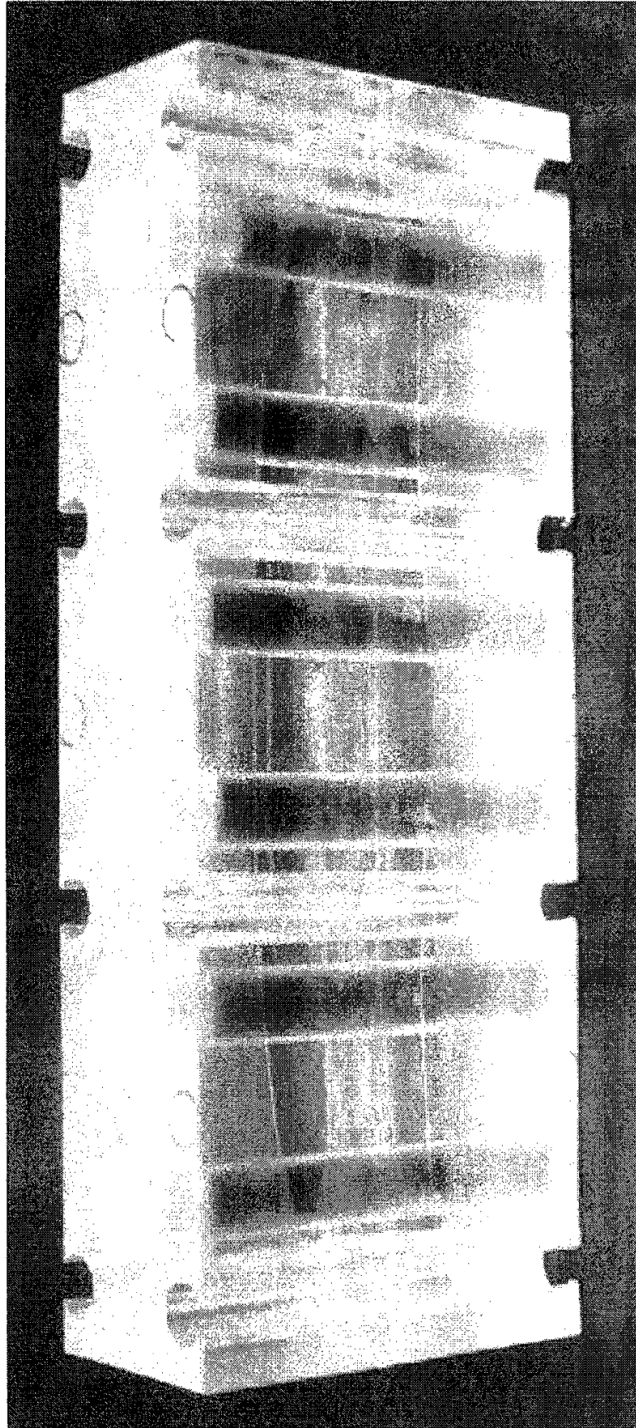


Figura 7

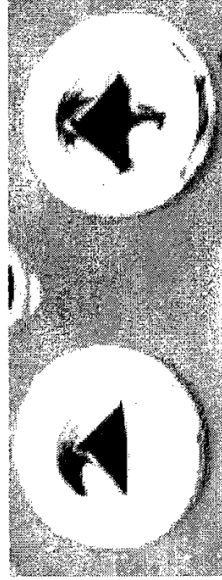


Figura 8

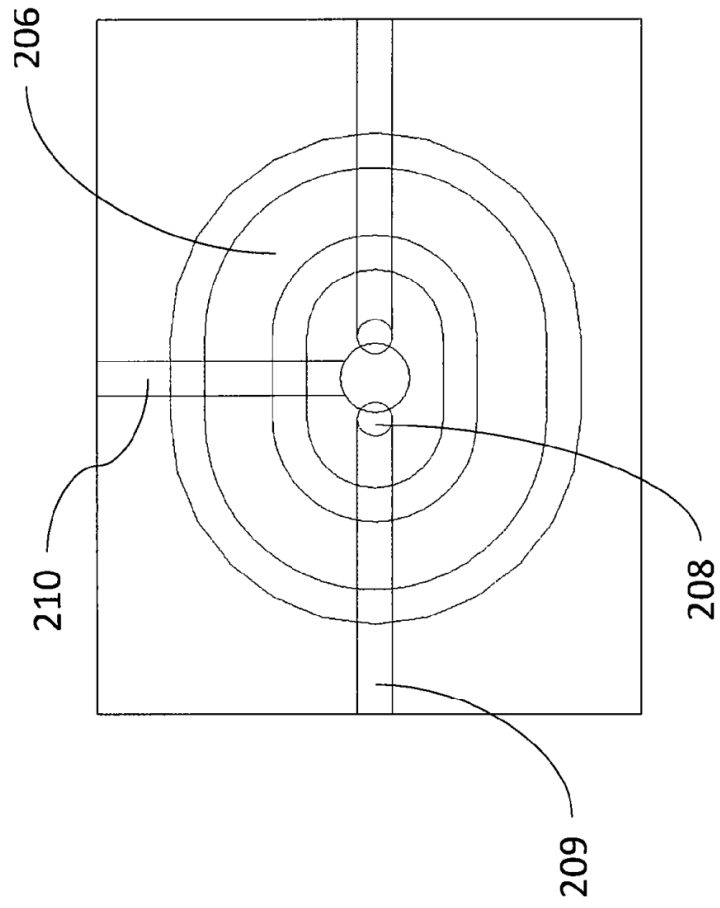


Figura 9

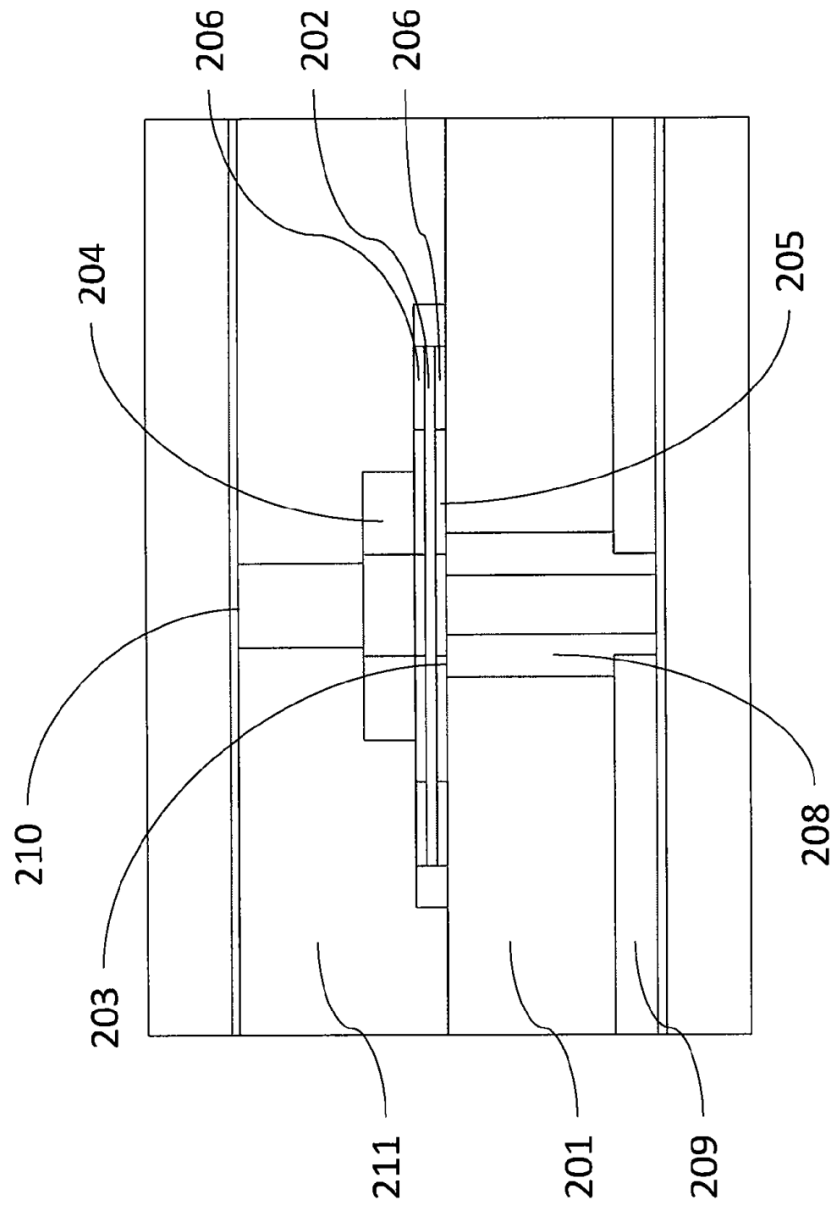


Figura 10

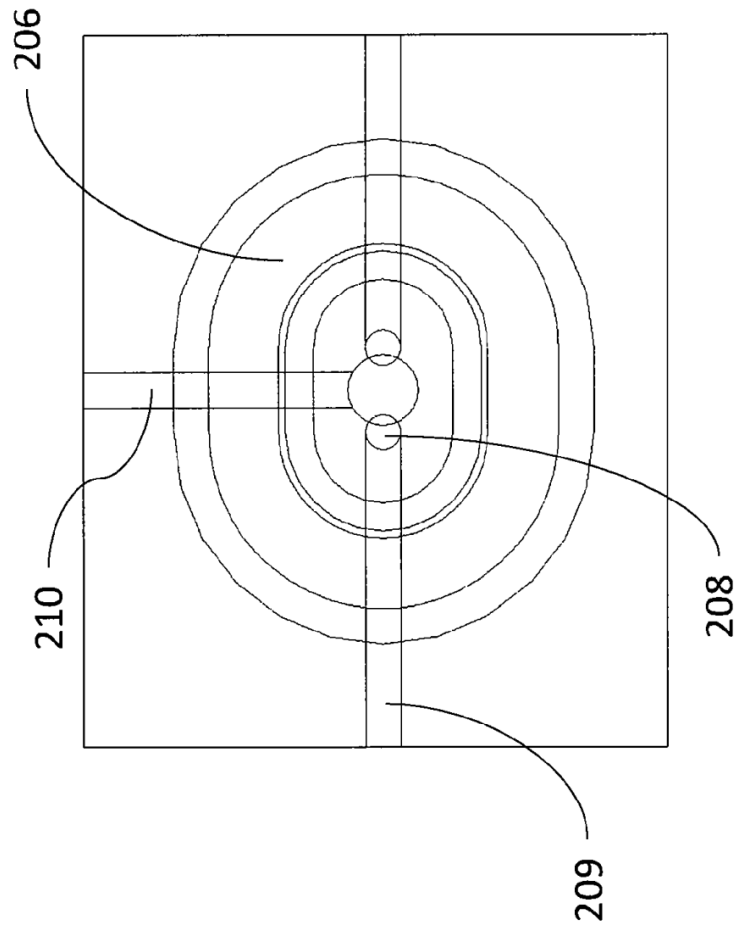


Figura 11

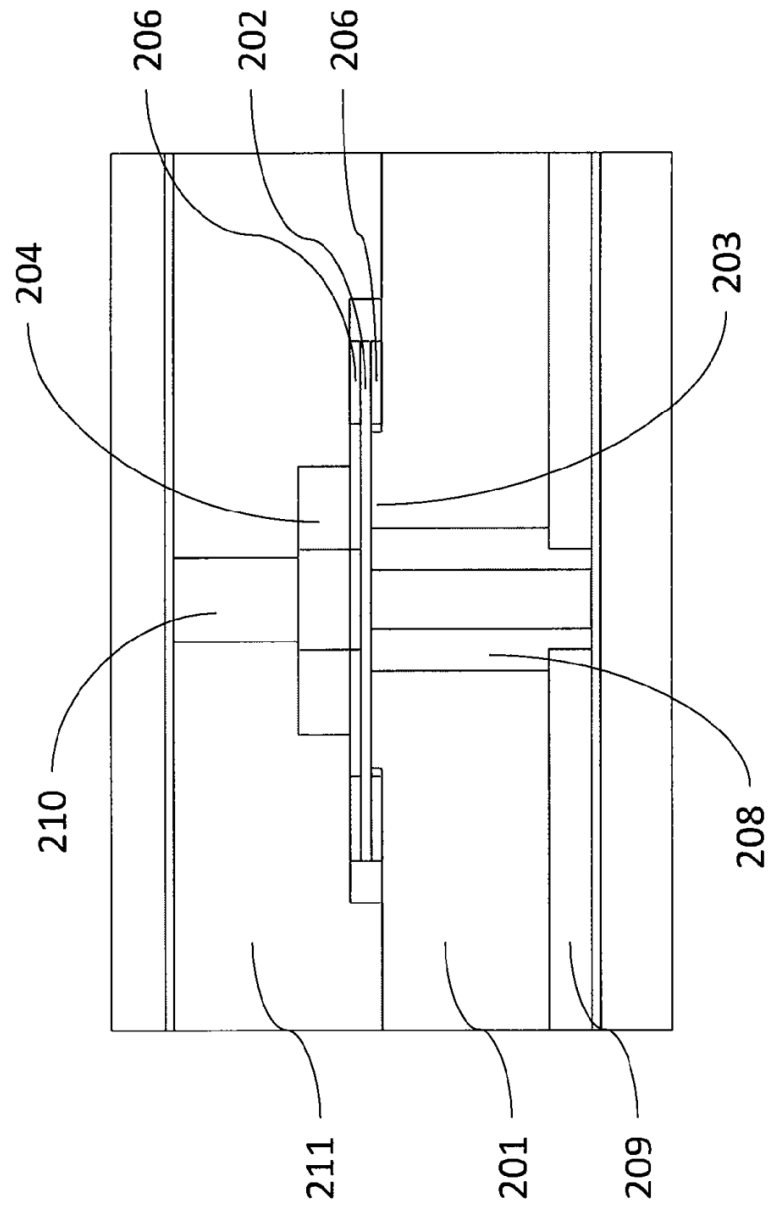


Figura 12

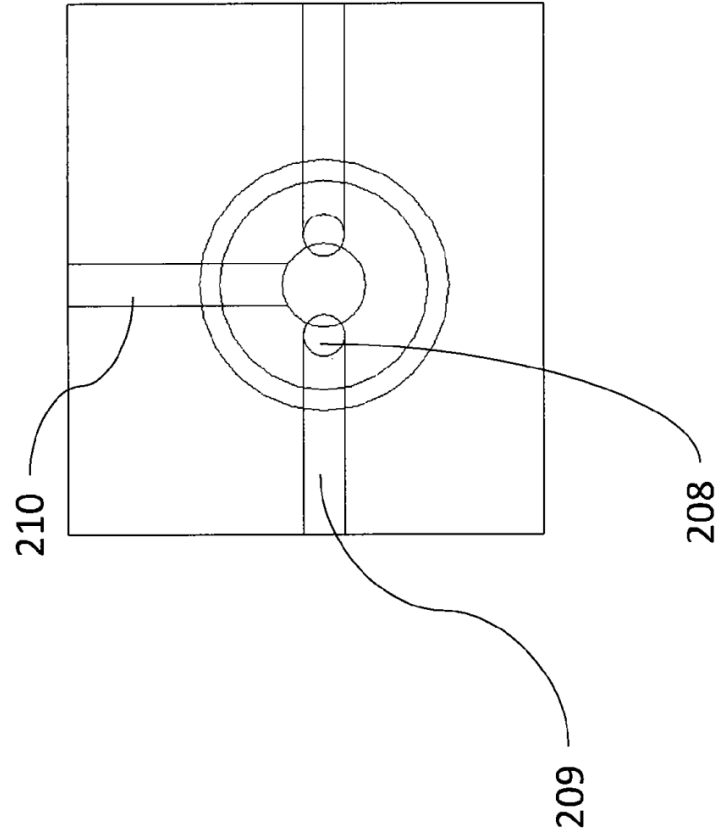


Figura 13

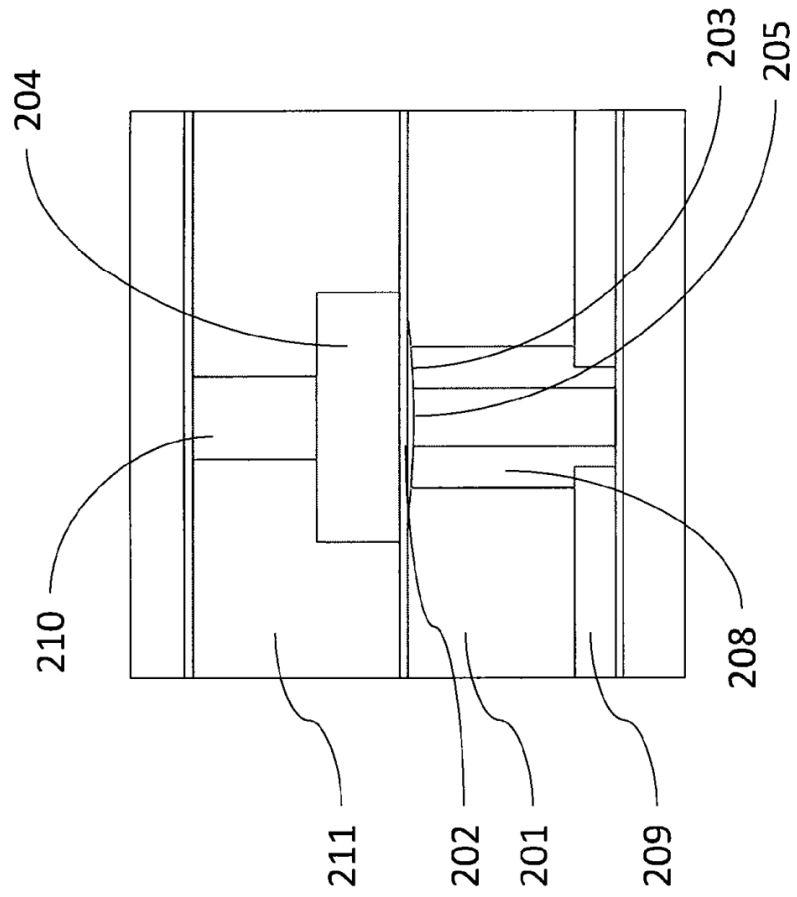


Figura 14

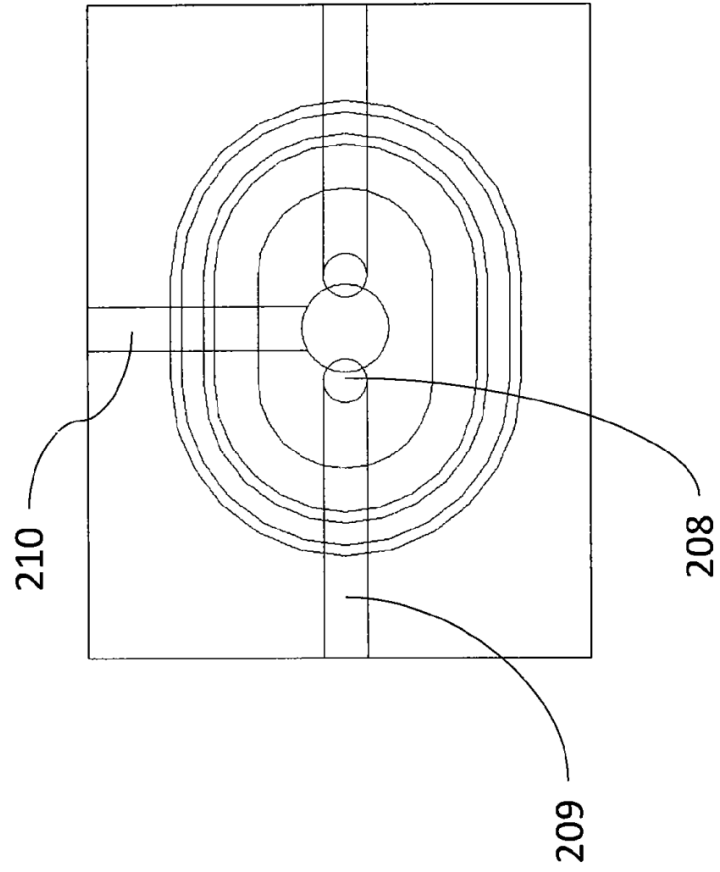


Figura 15

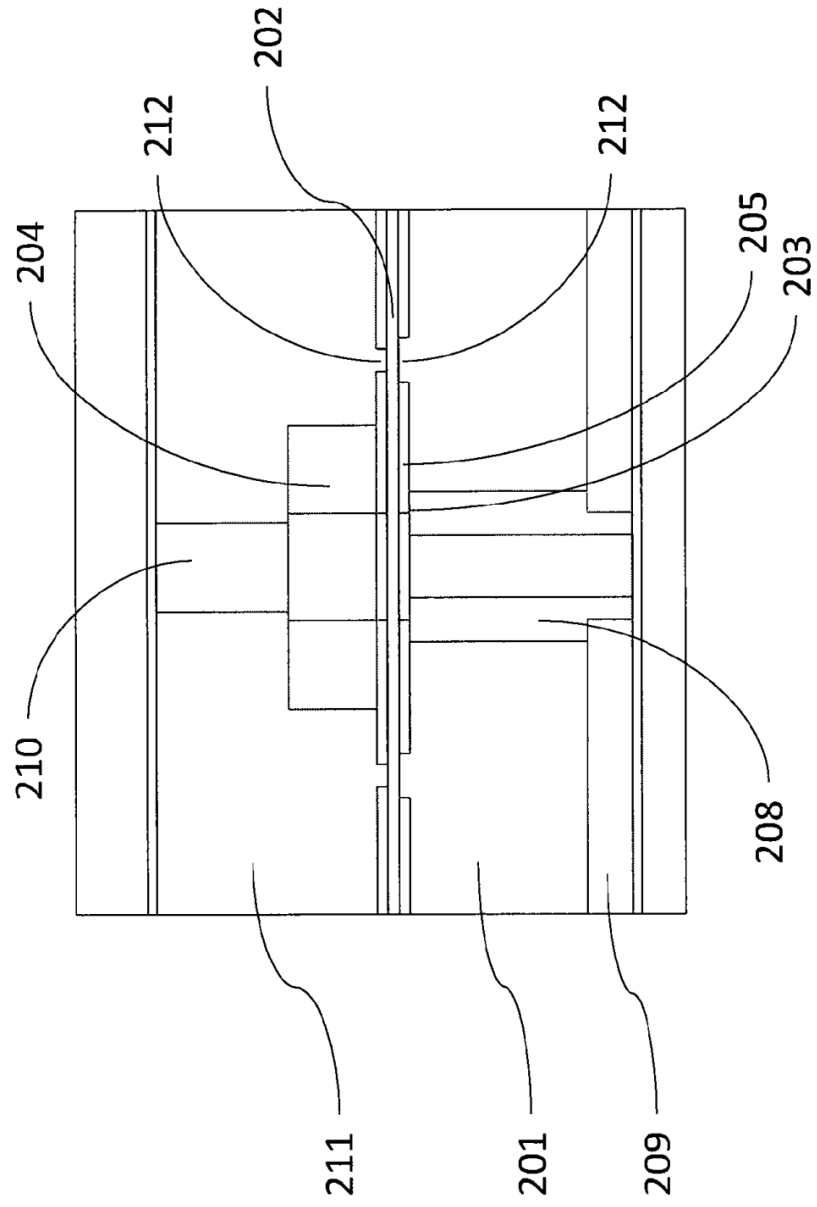


Figura 16

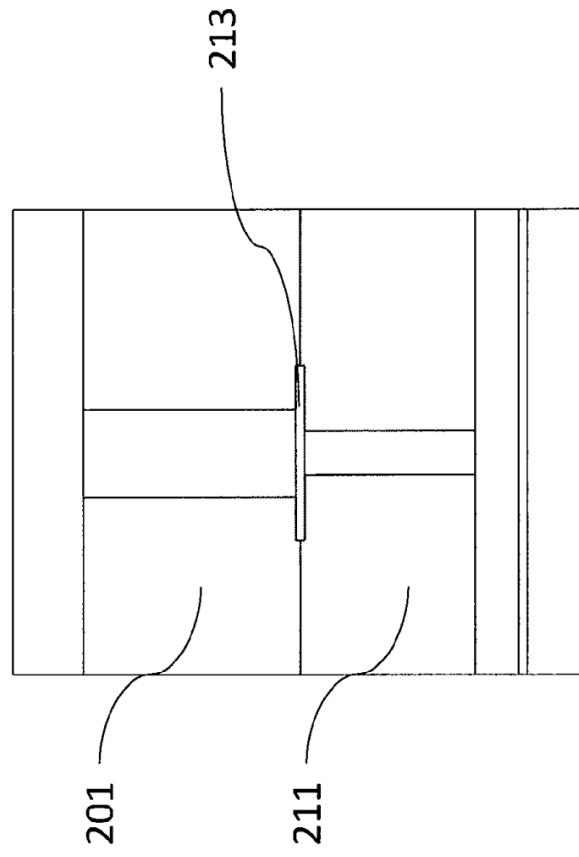


Figura 17

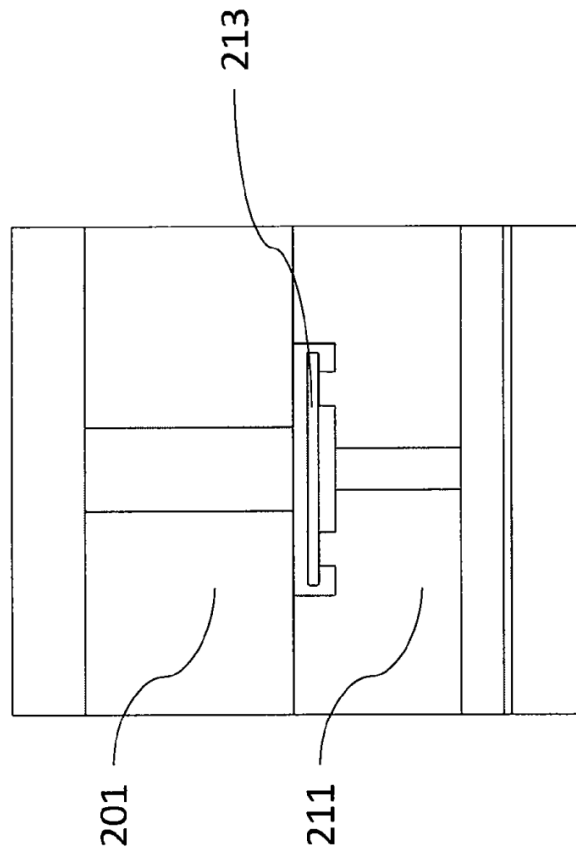


Figura 18

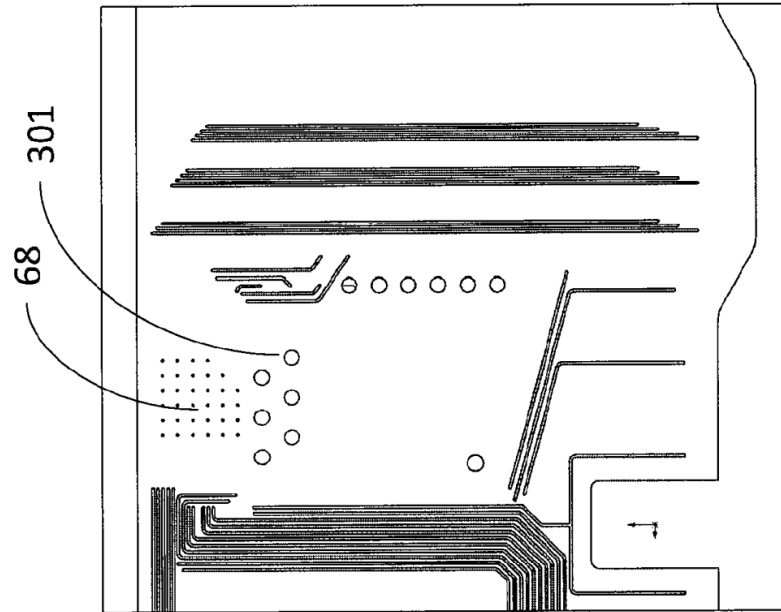


Figura 19

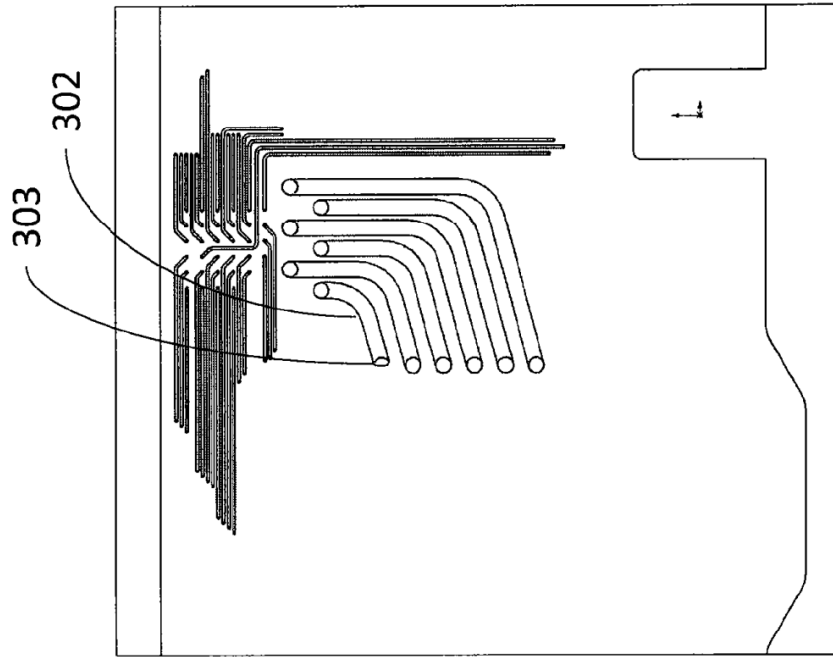


Figura 20 Fluídica

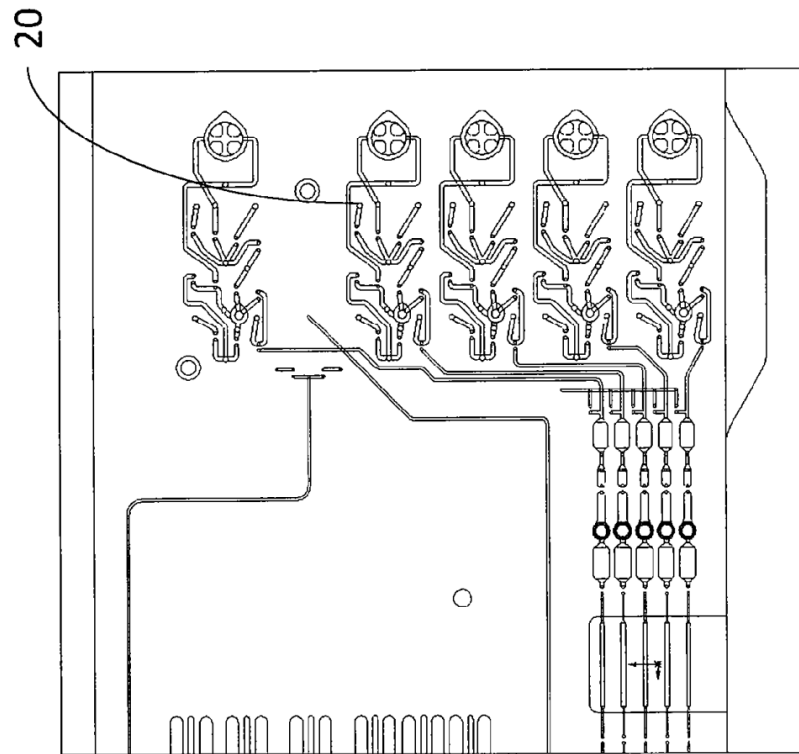


Figura 21

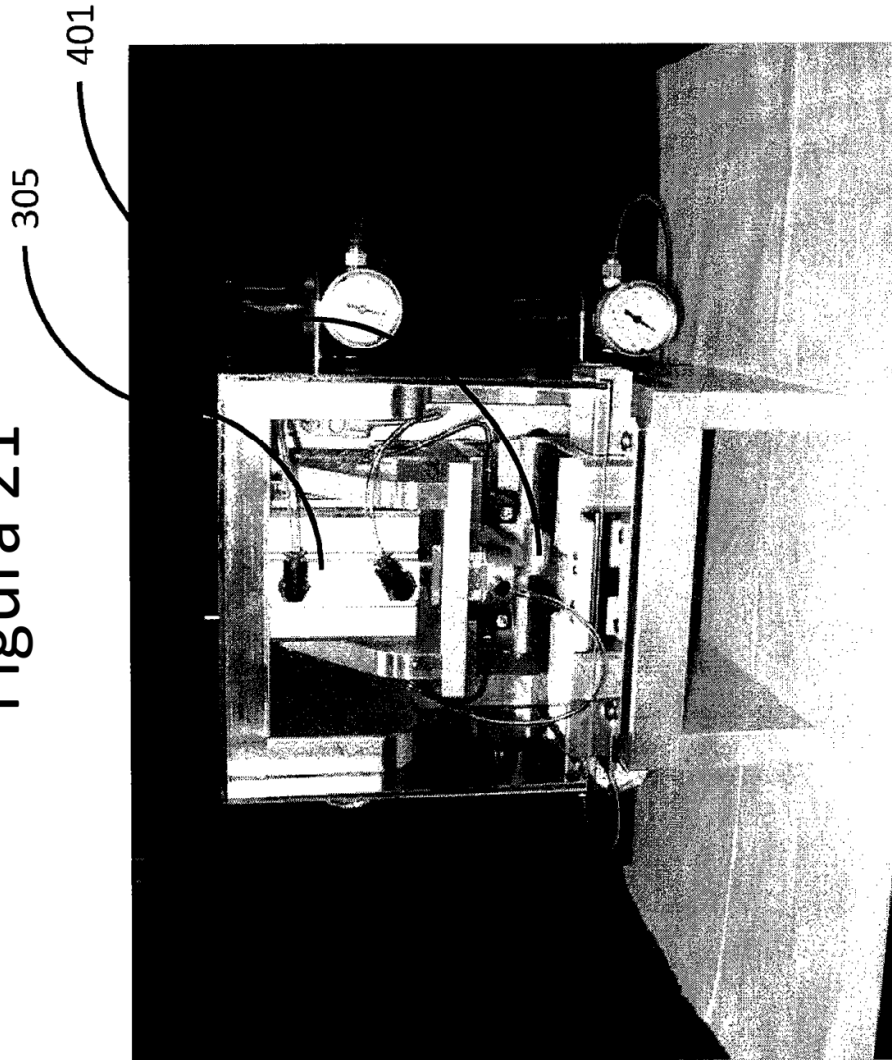


Figura 22

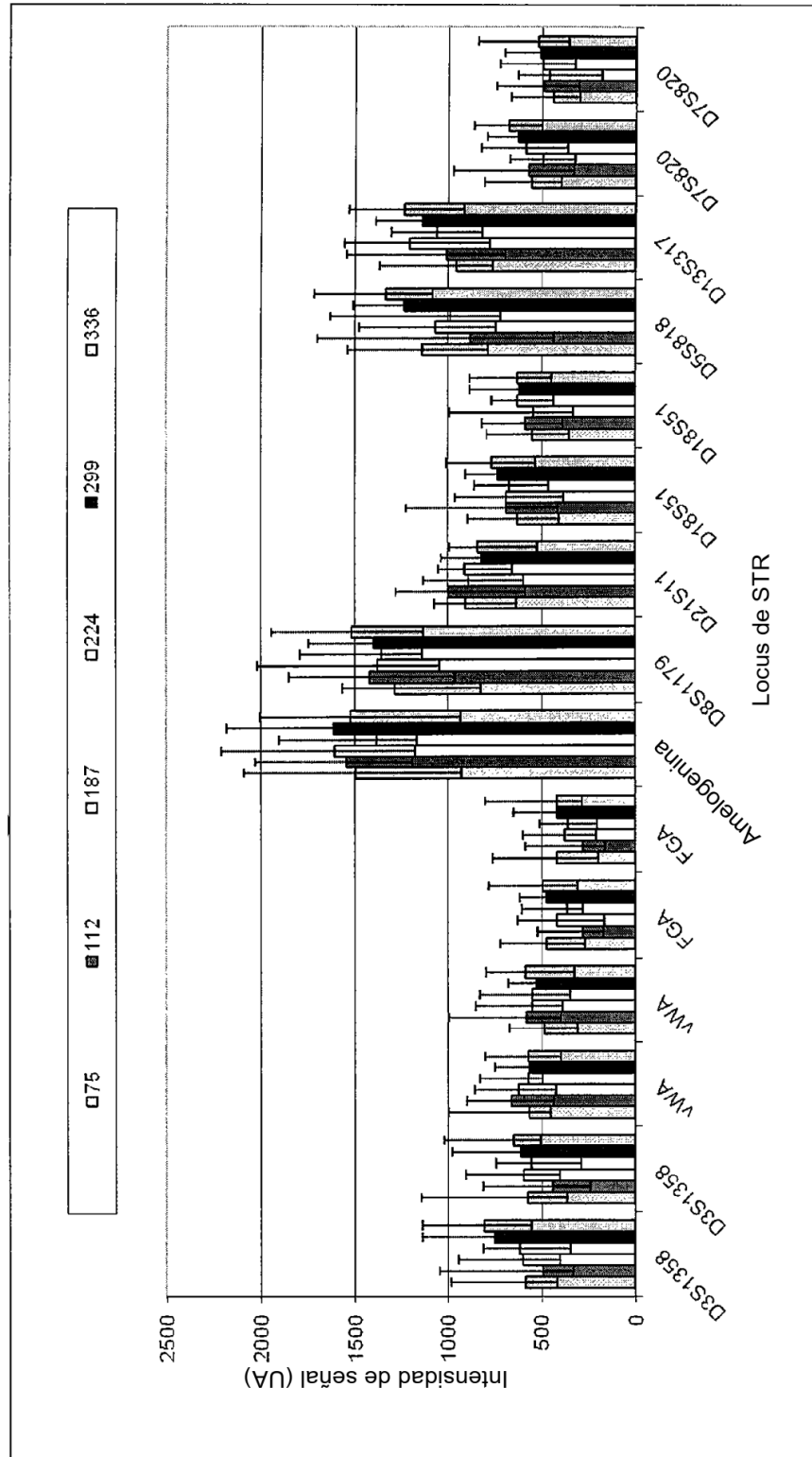


Figura 23

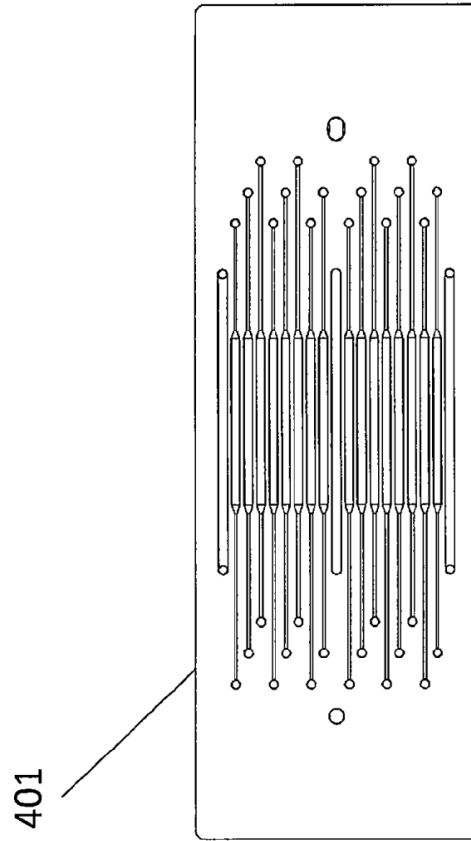


Figura 24

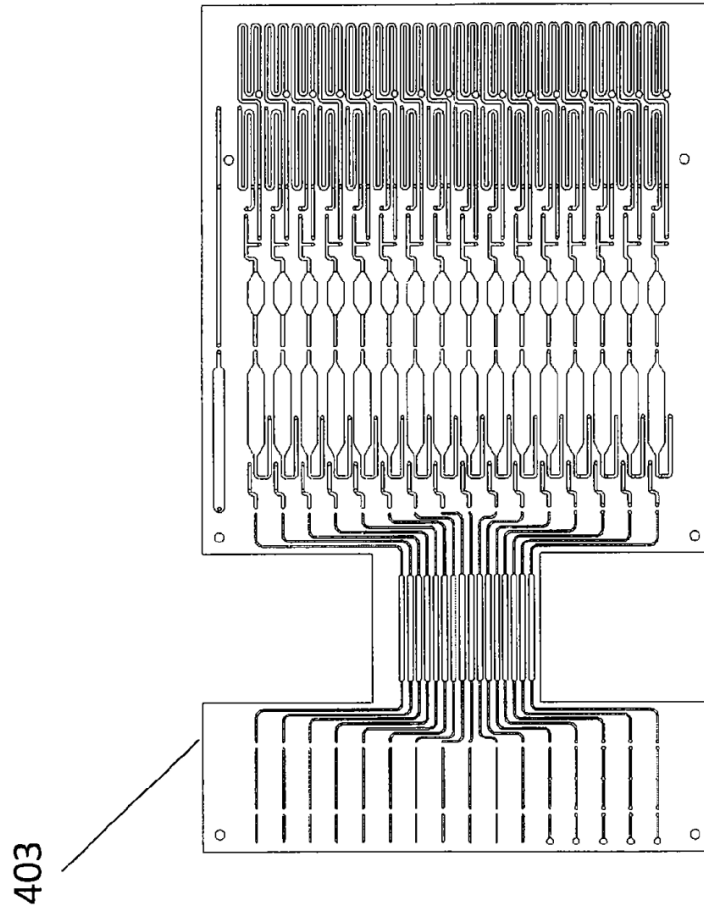


Figura 25

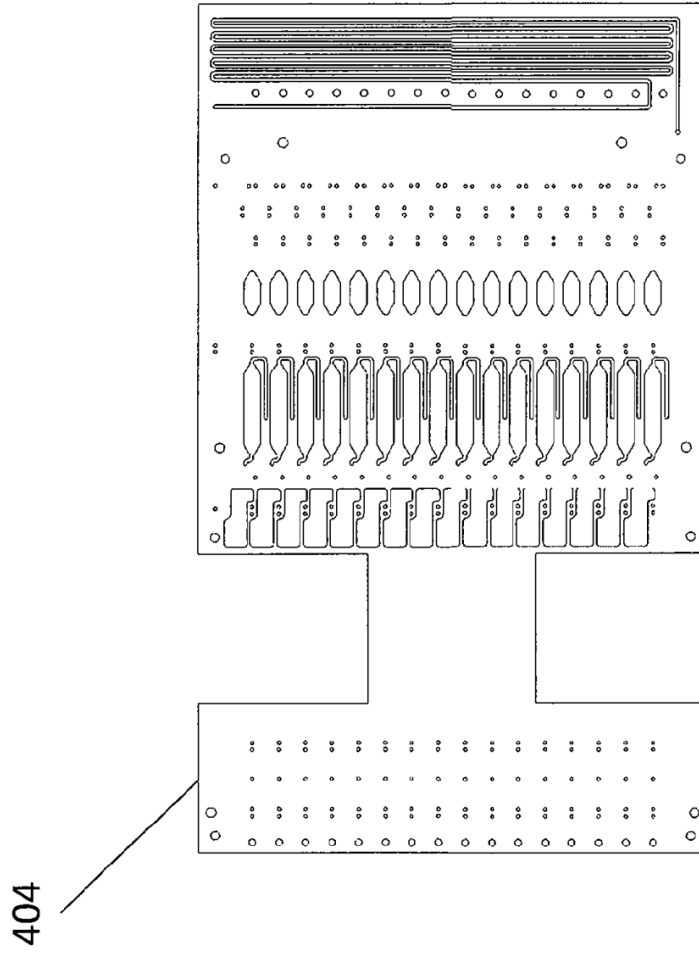


Figura 26

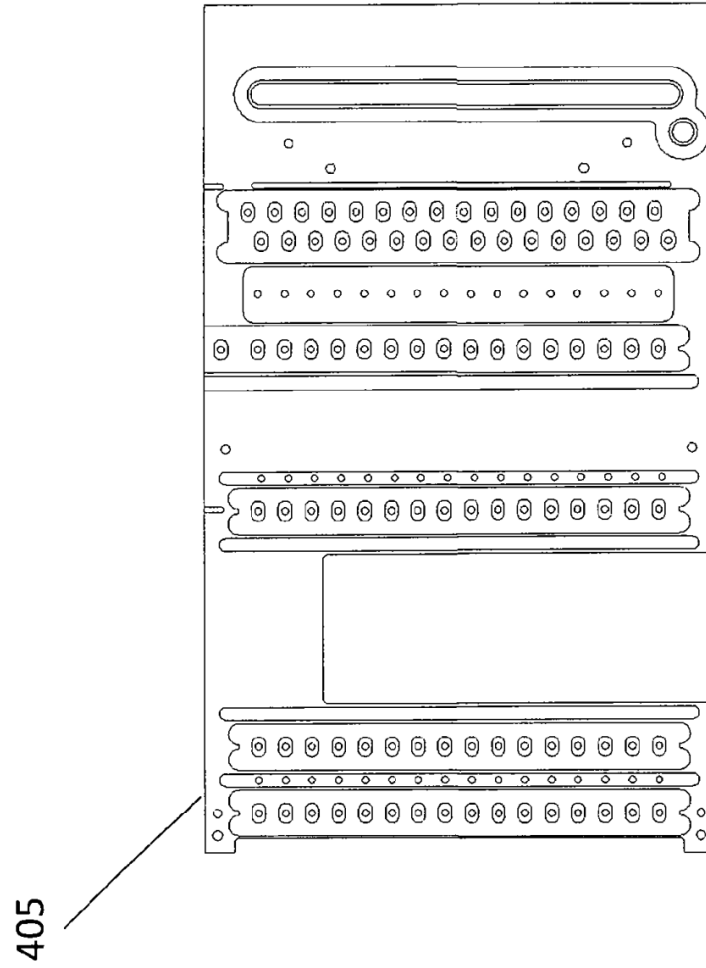


Figura 27

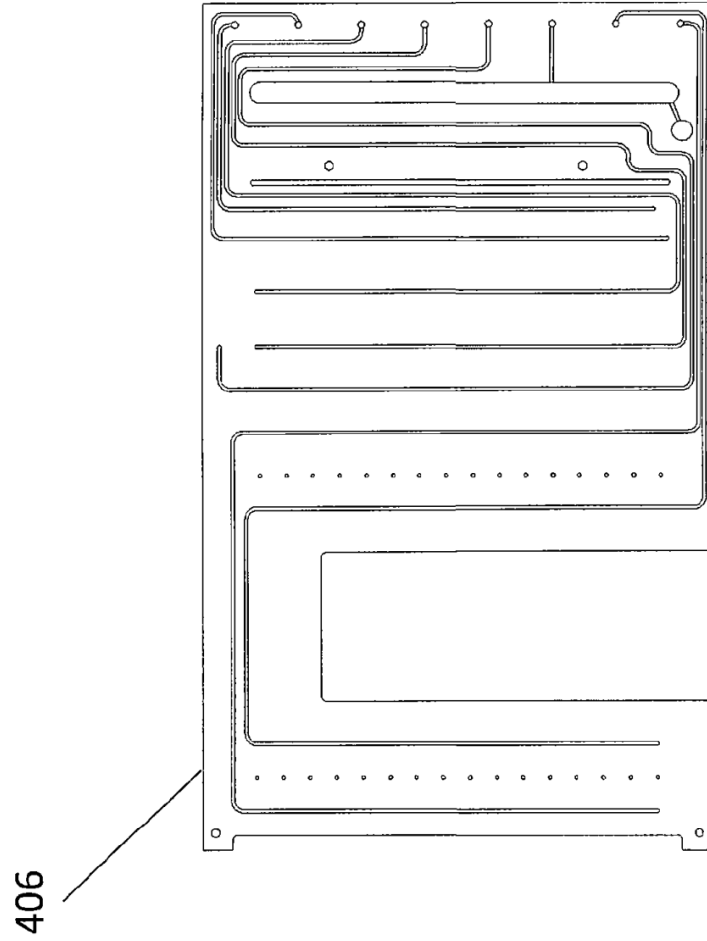


Figura 28

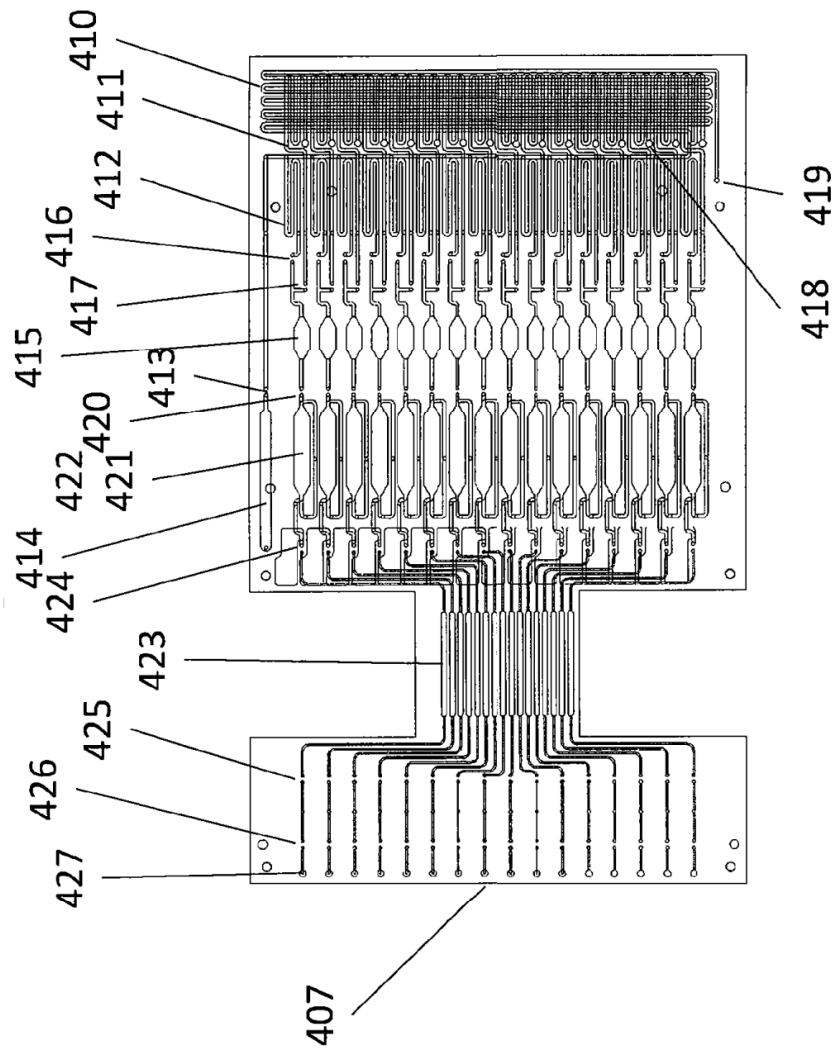


Figura 29

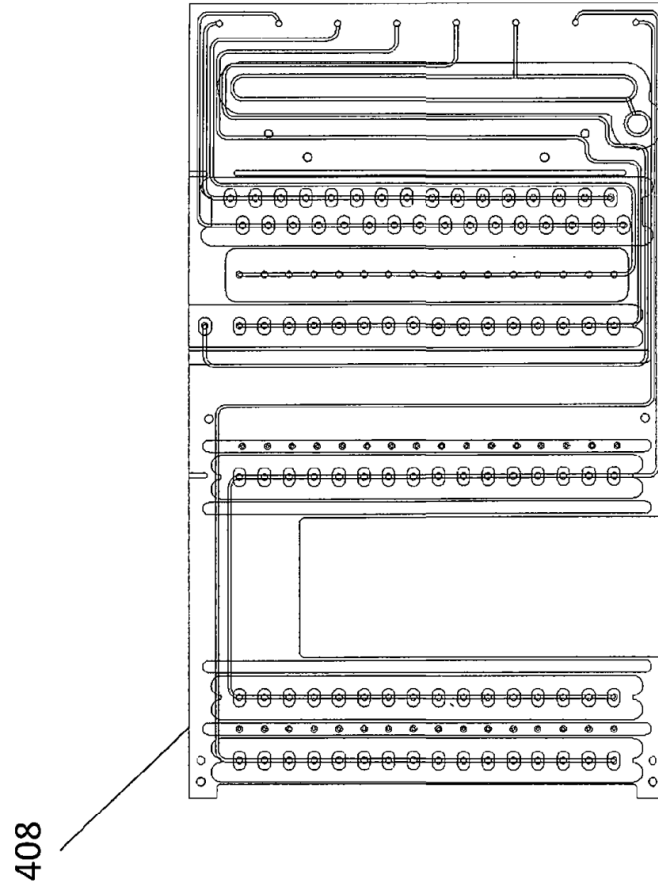


Figura 30

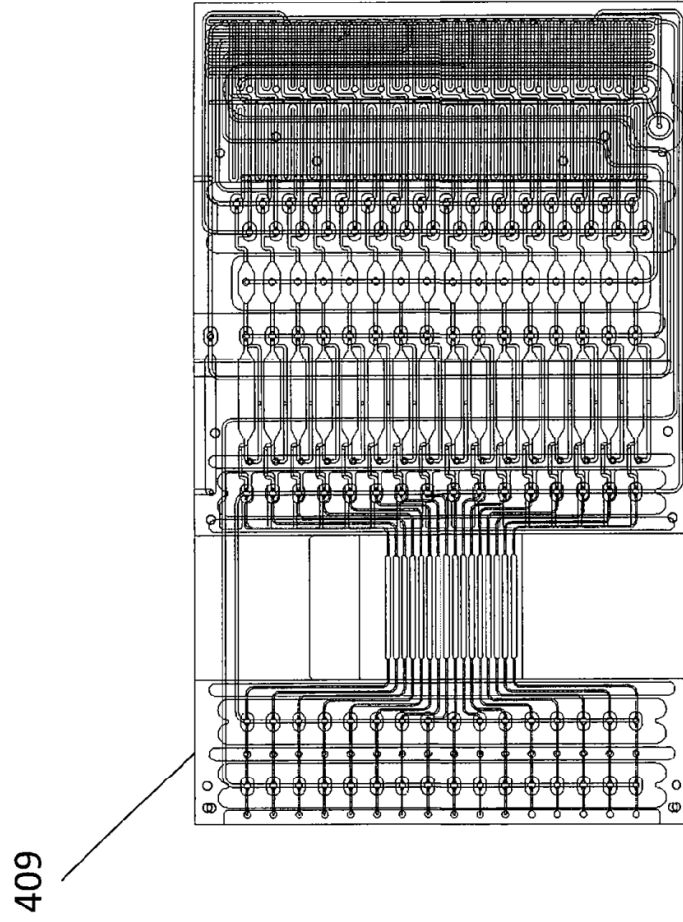


Figura 31

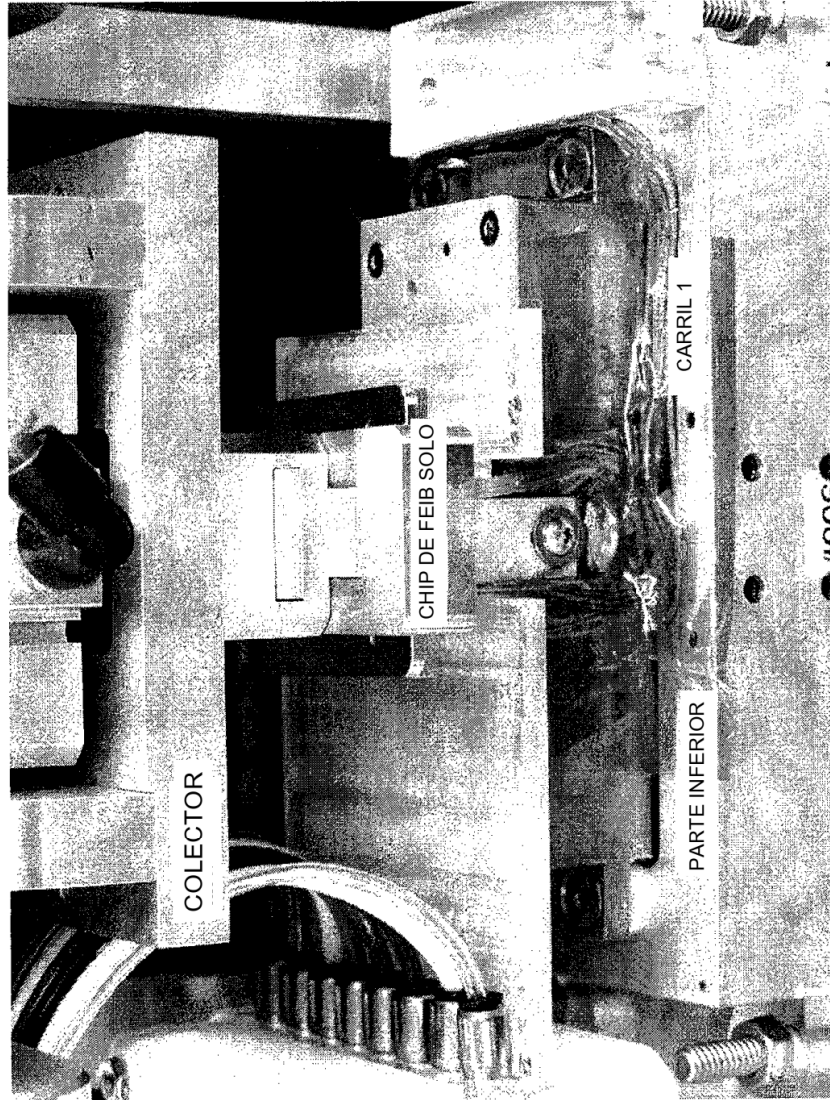


Figura 32

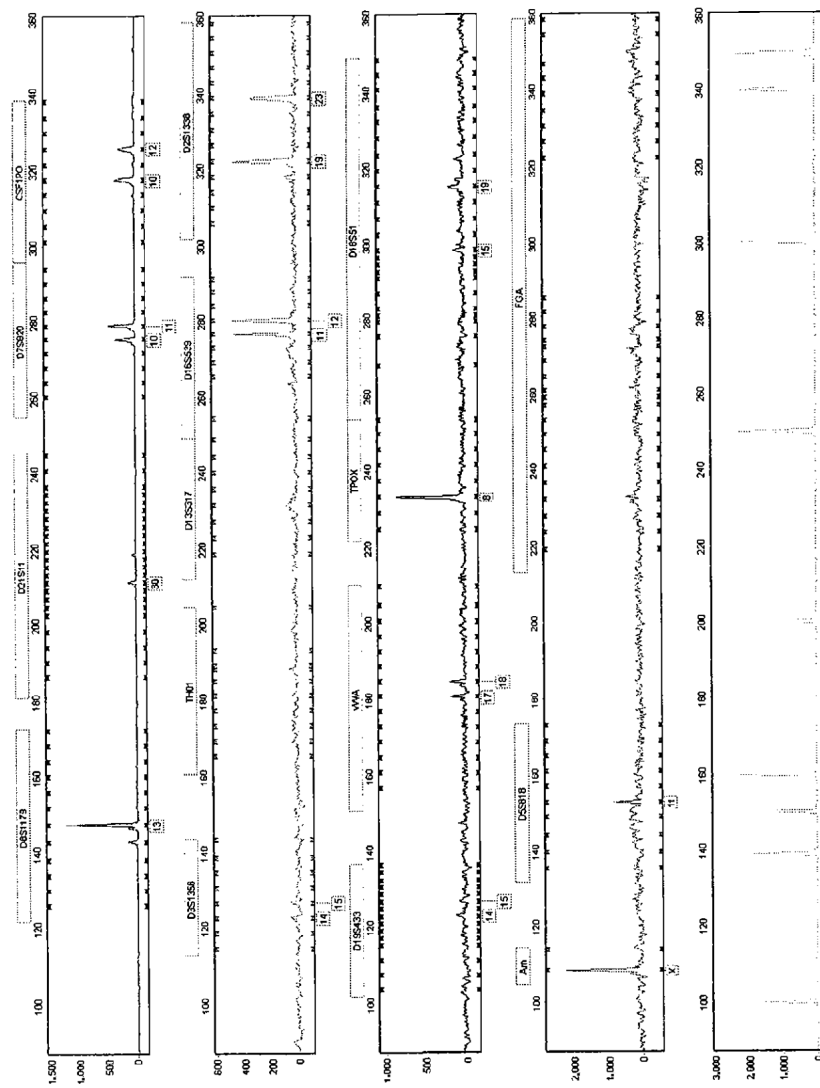


Figura 33

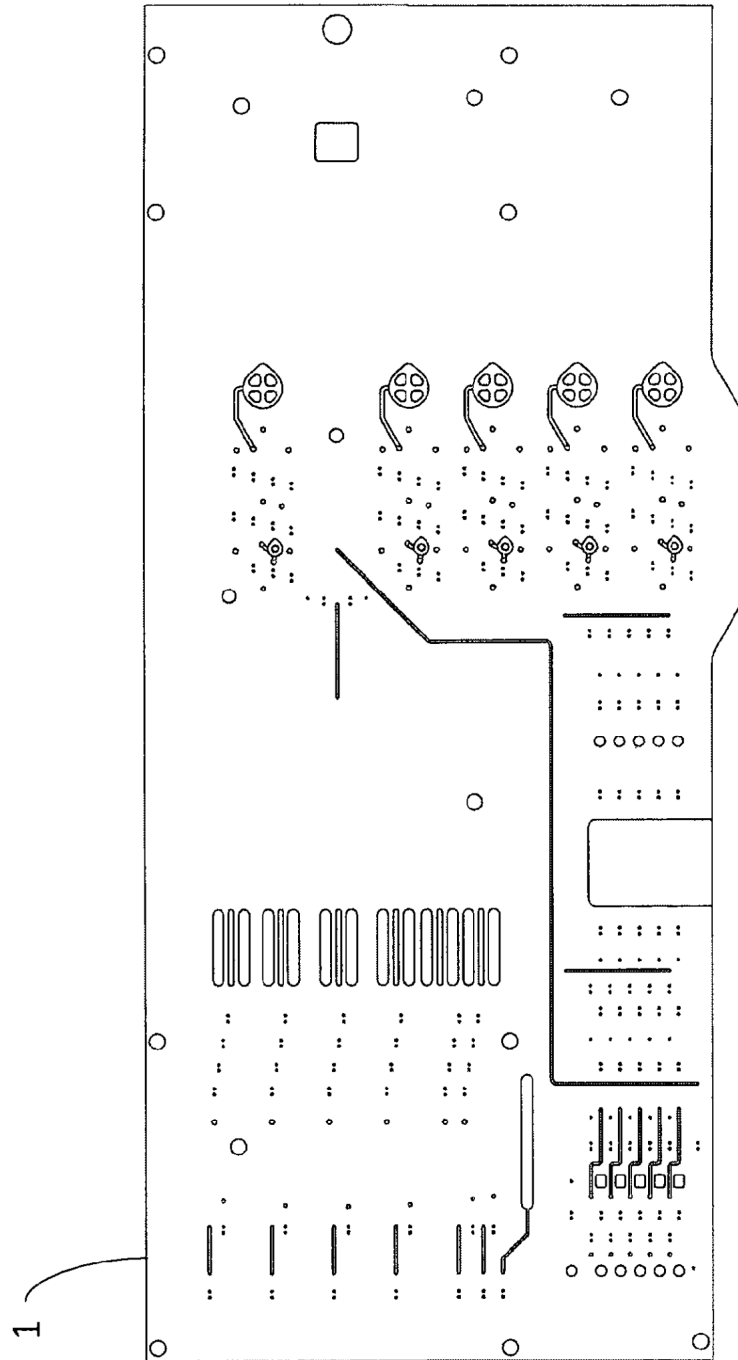


Figura 34

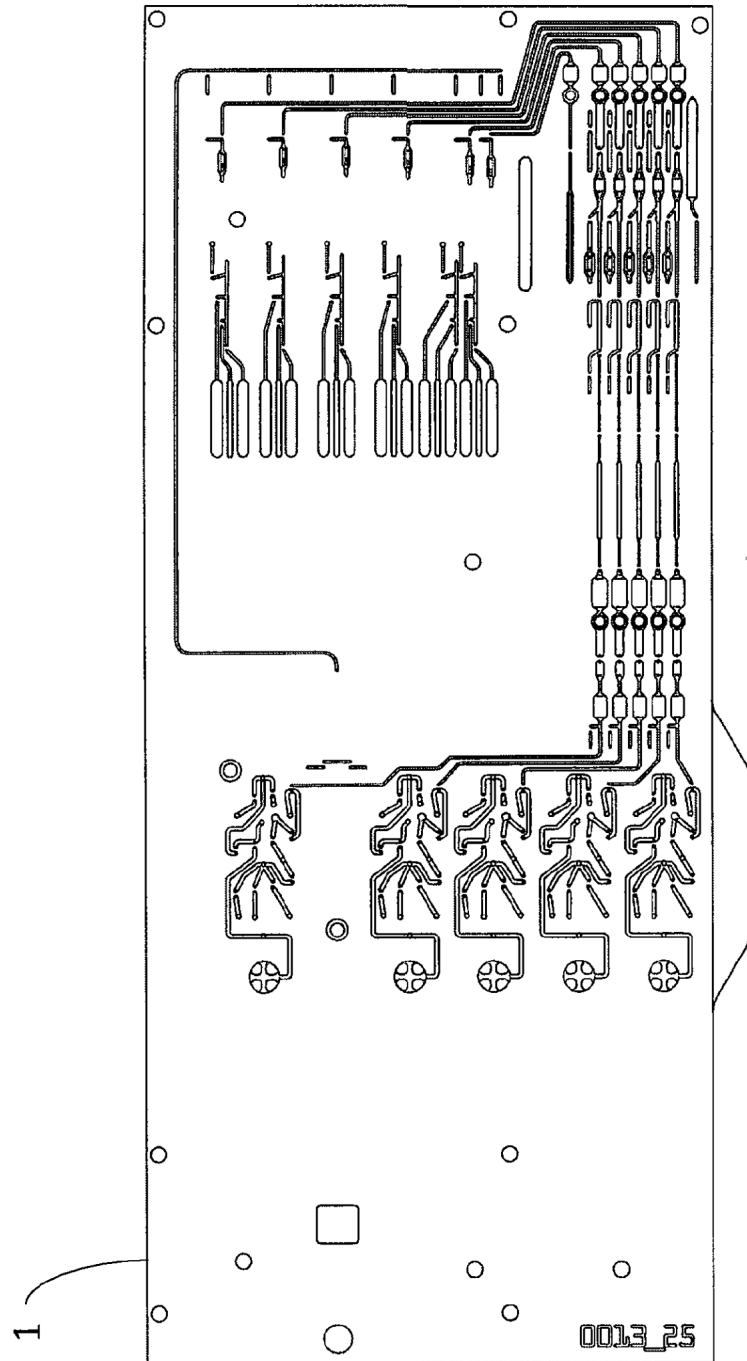


Figura 35

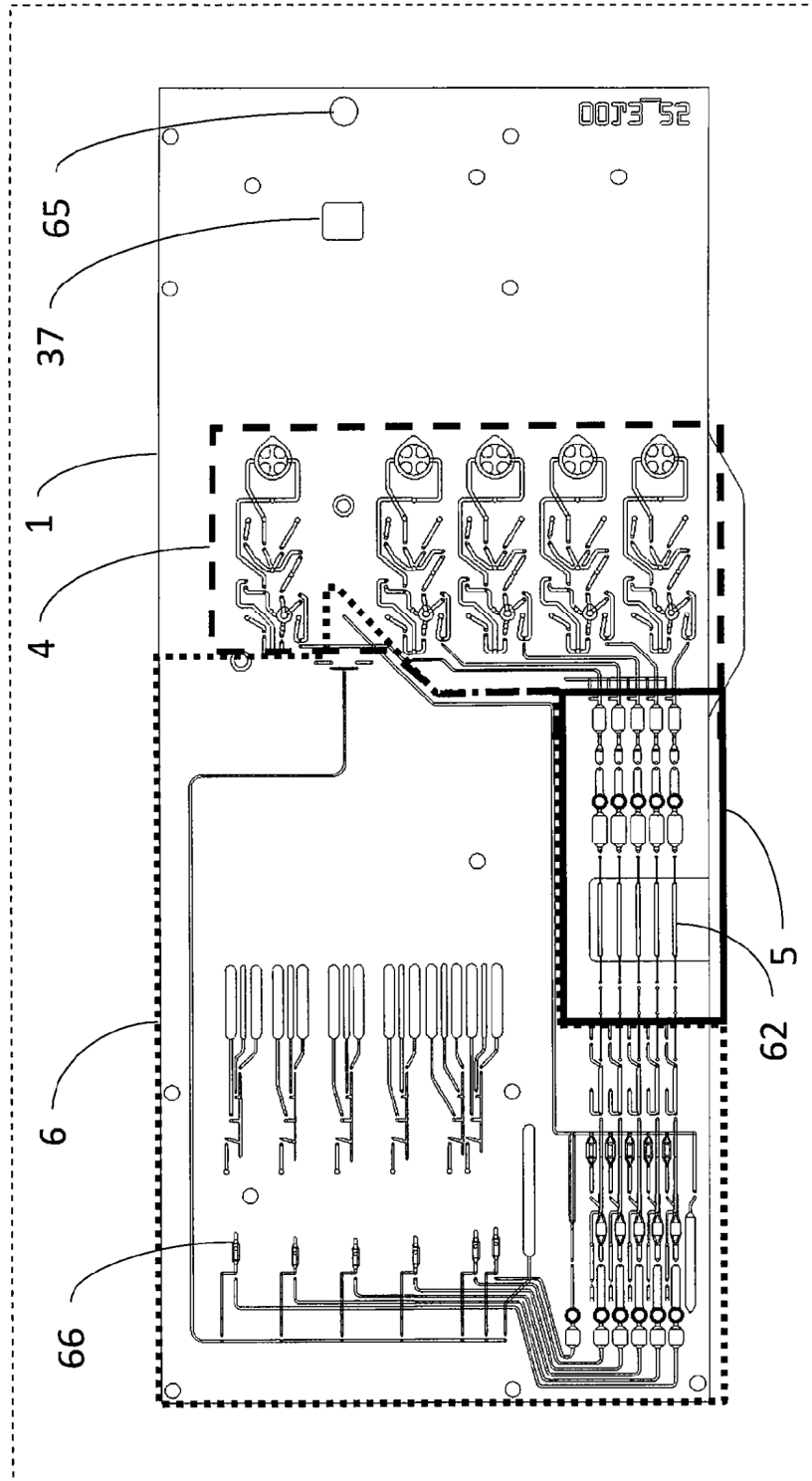


Figura 36

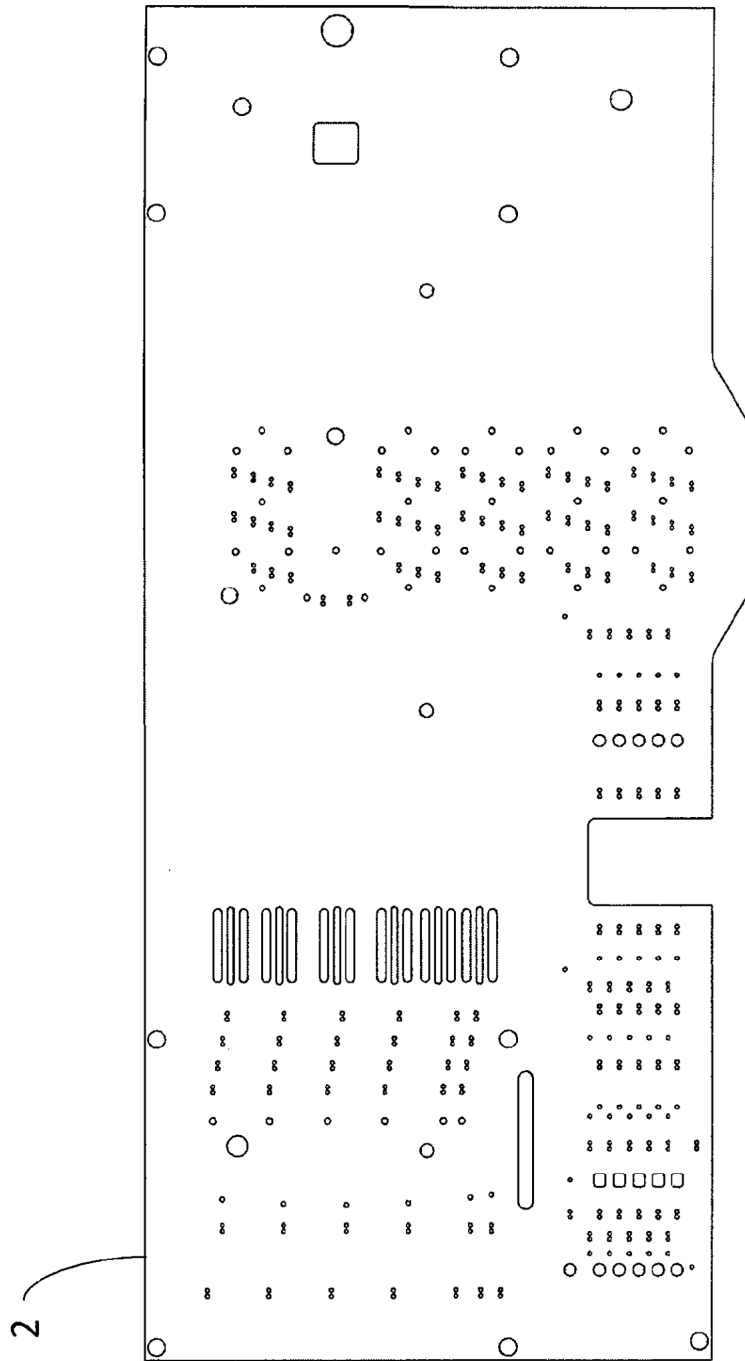


Figura 37

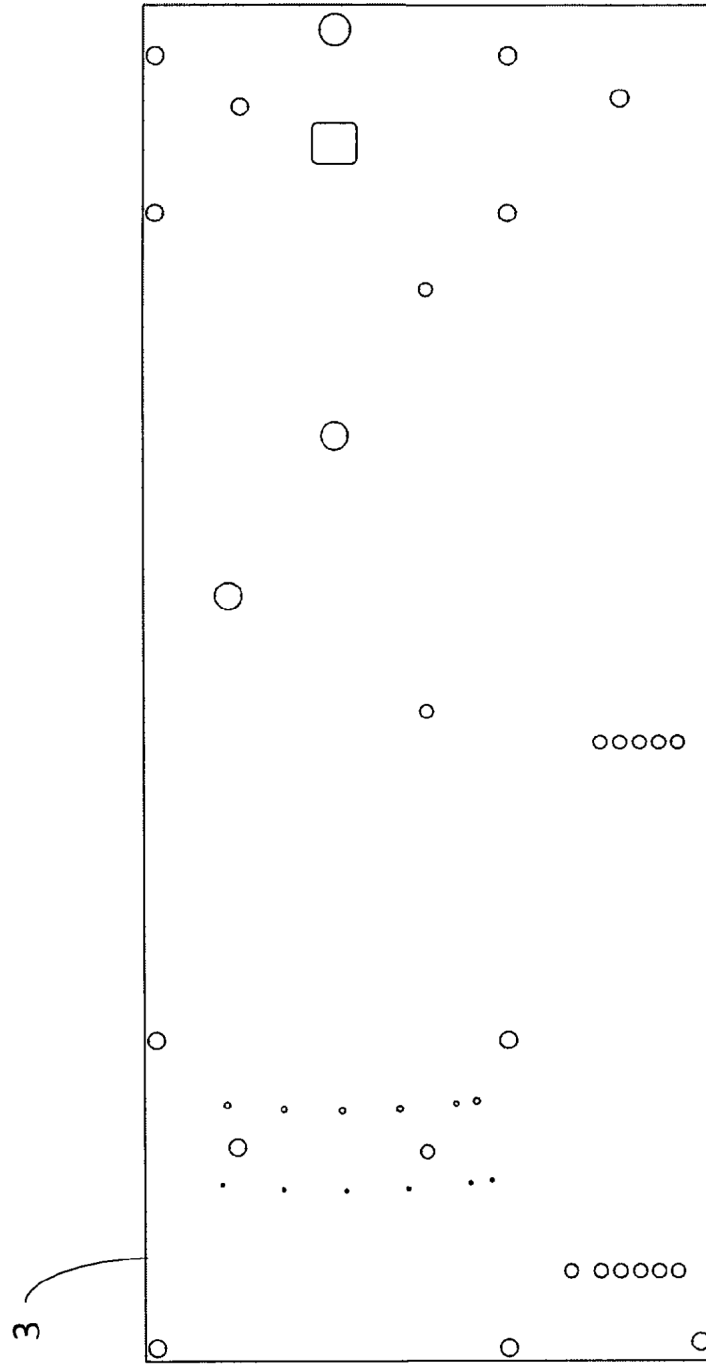


Figura 38

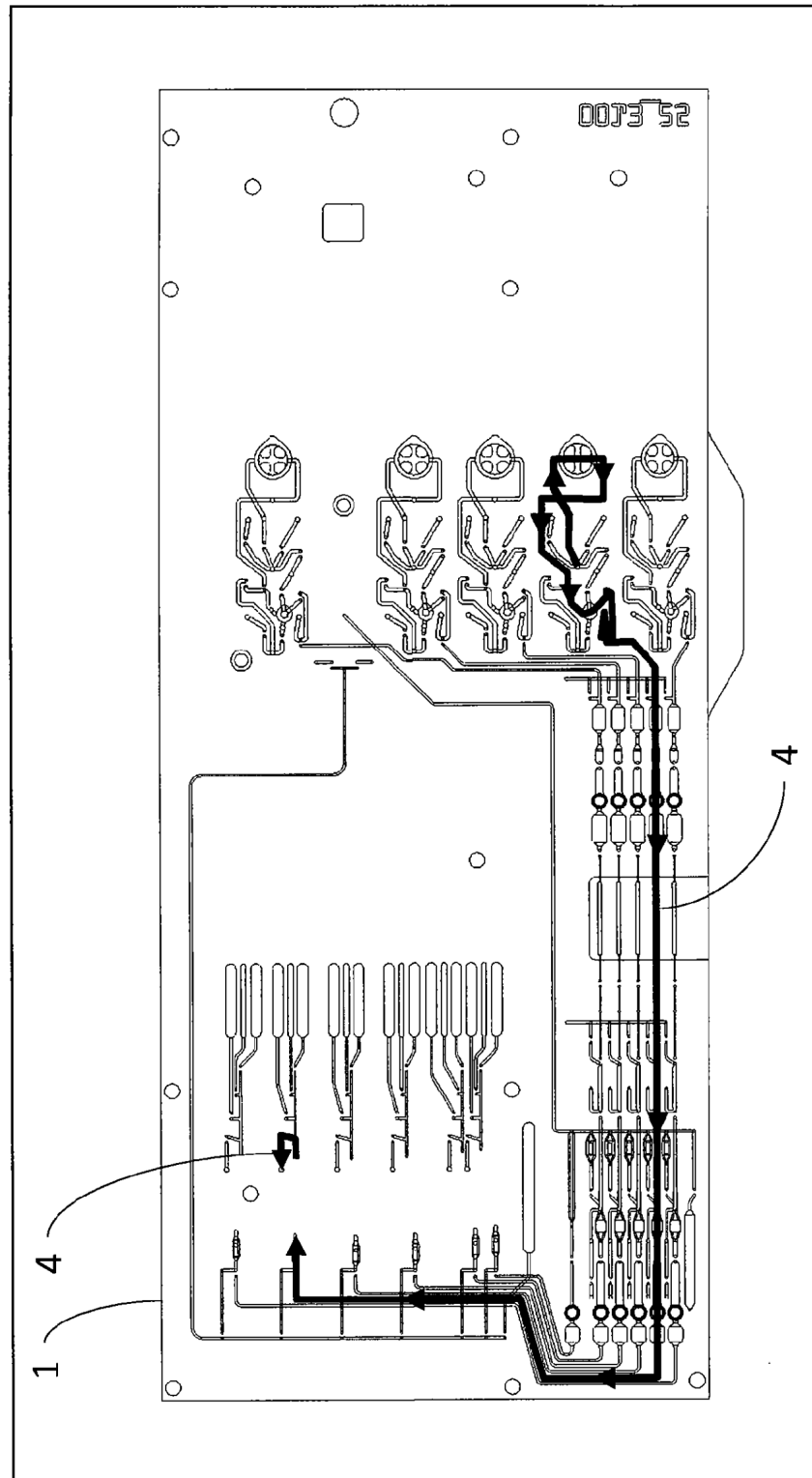


Figura 39

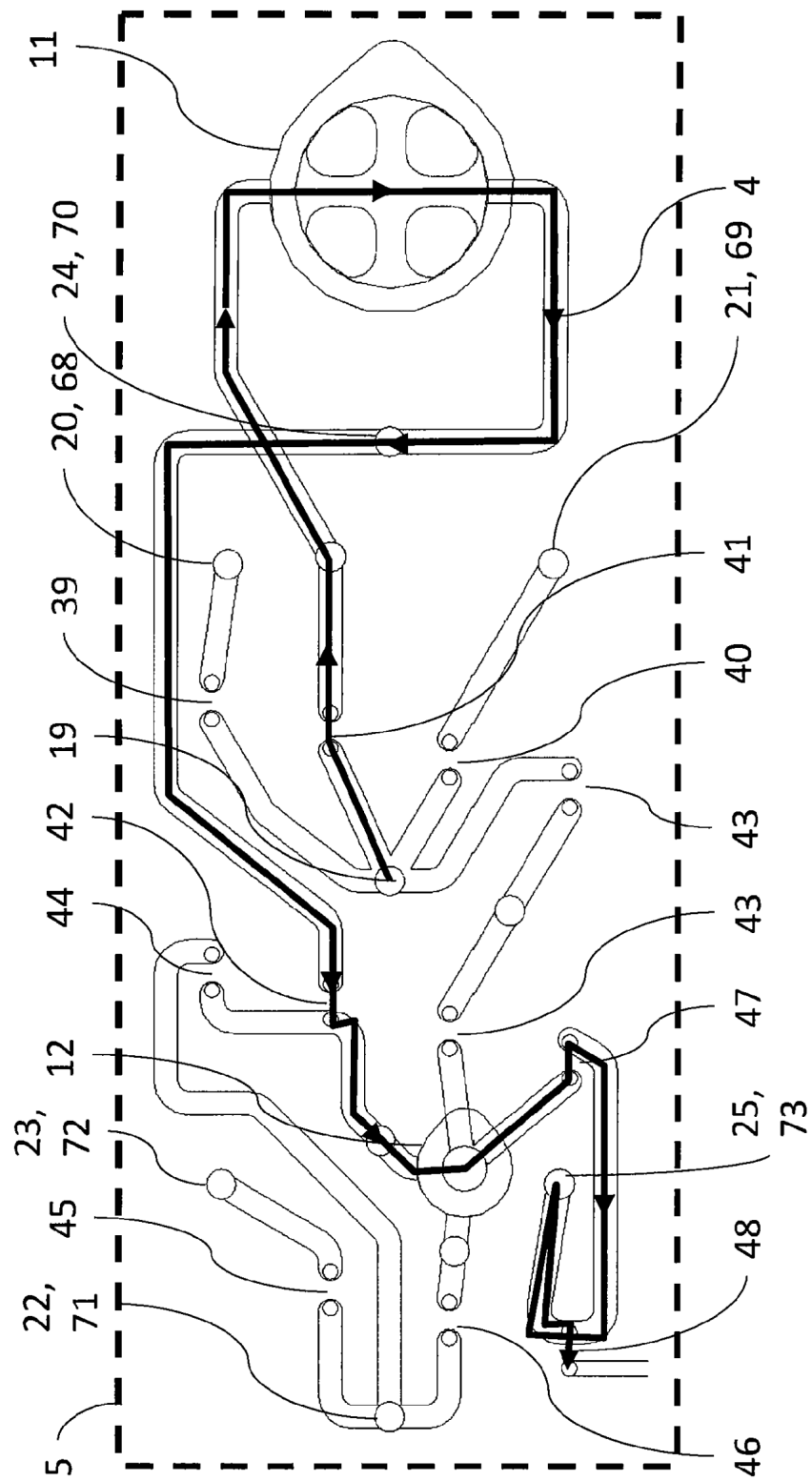


Figura 40

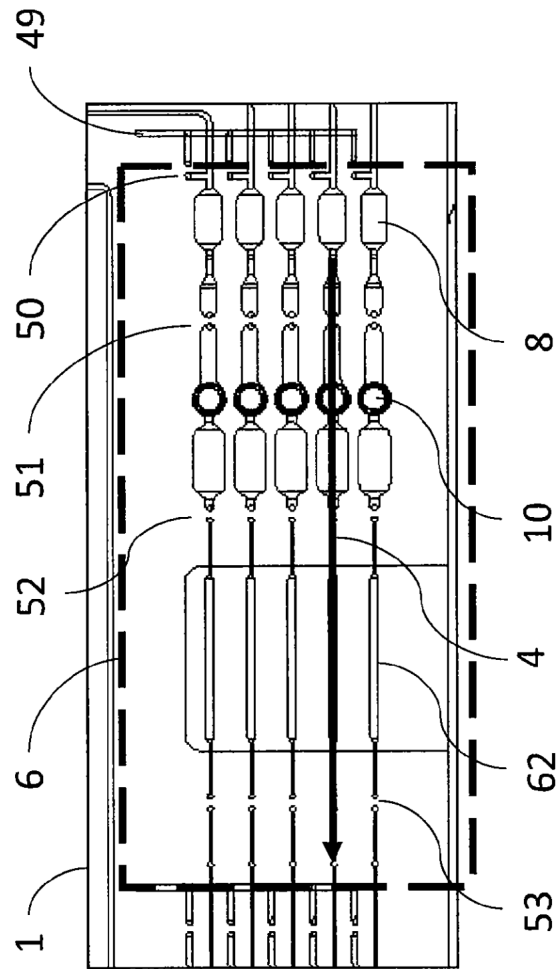


Figura 41

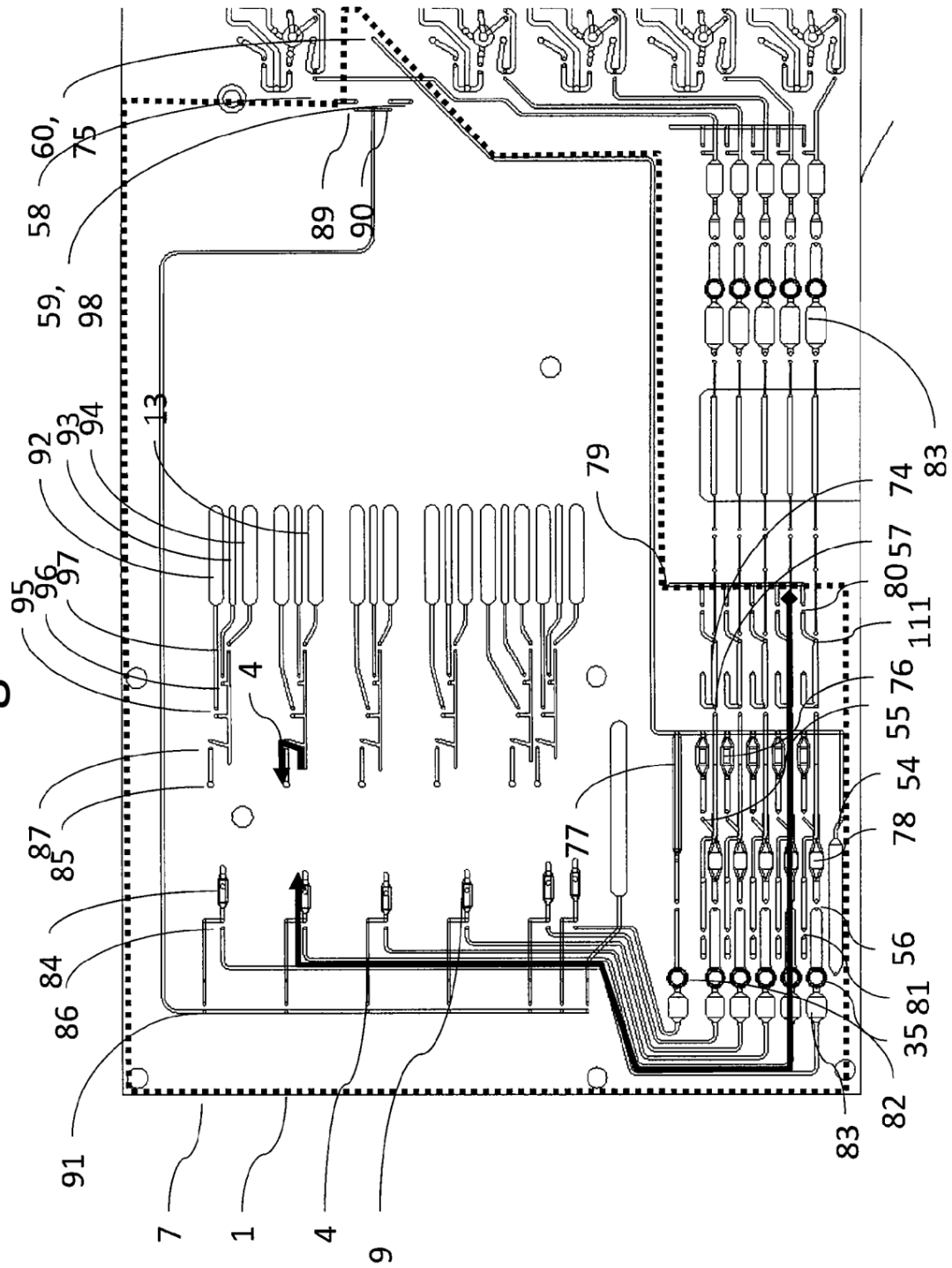


Figura 42

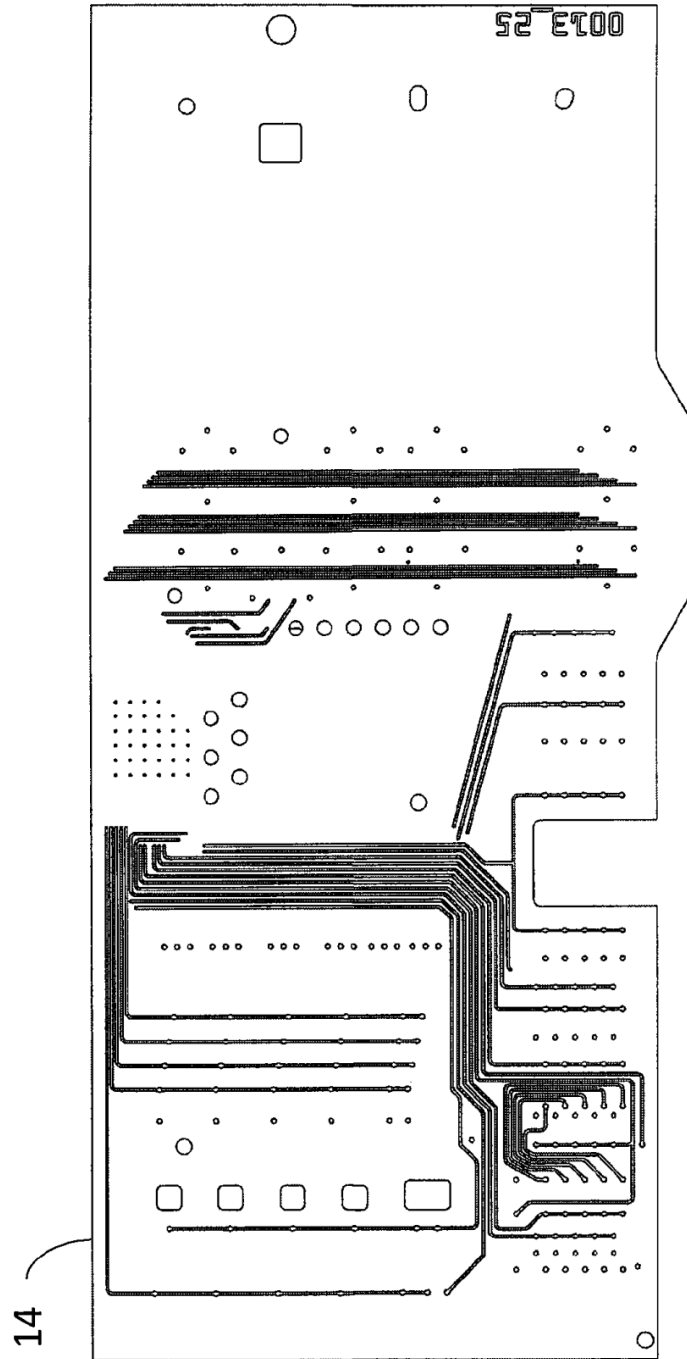


Figura 43

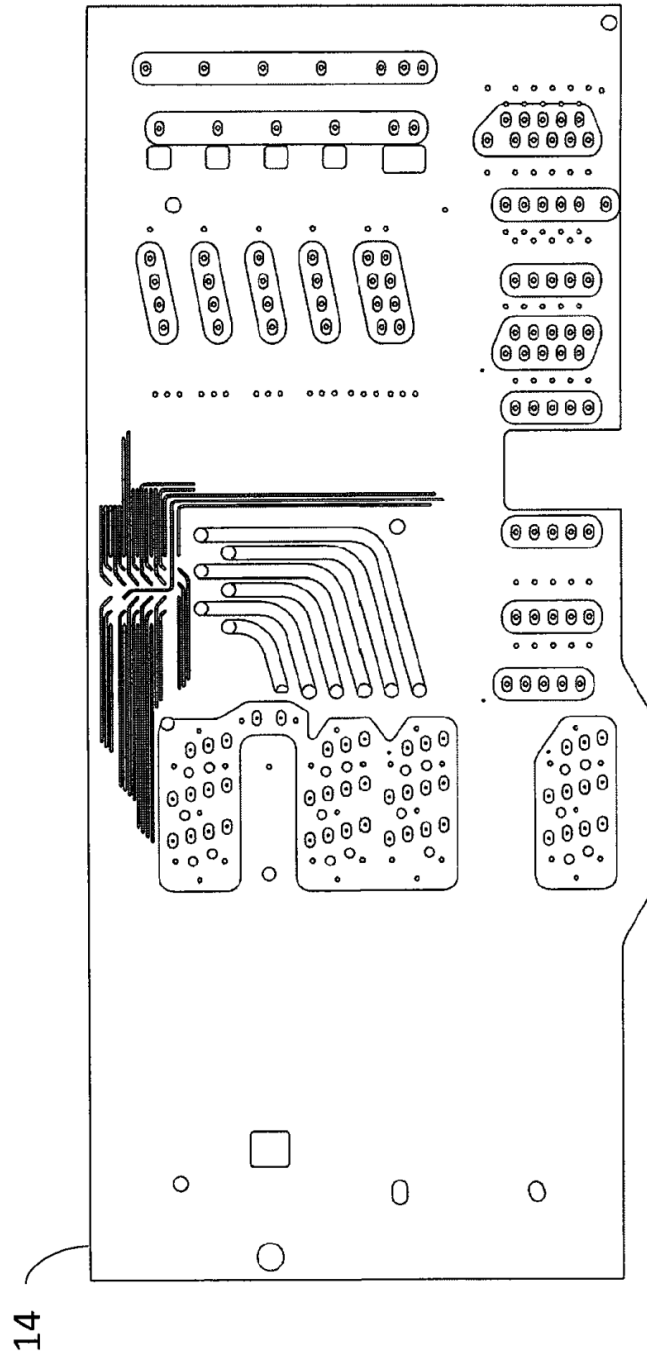


Figura 44

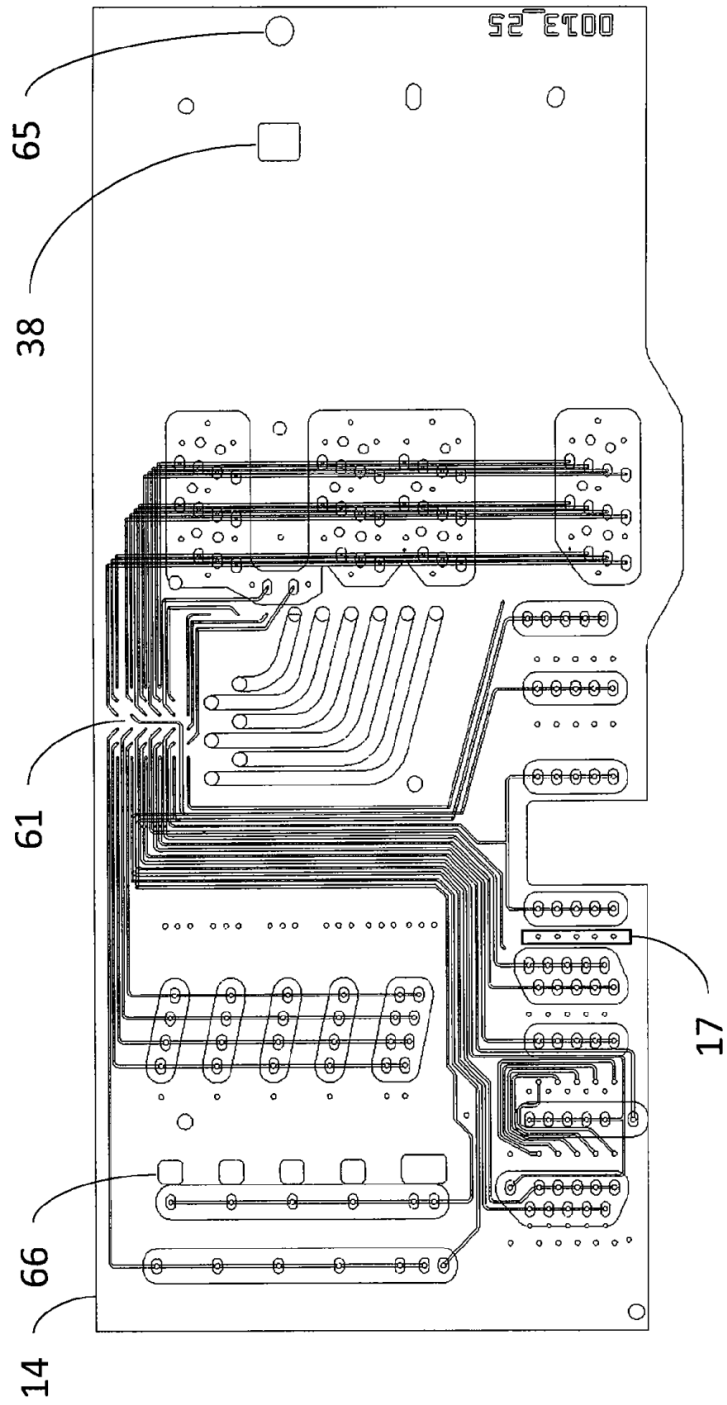


Figura 45

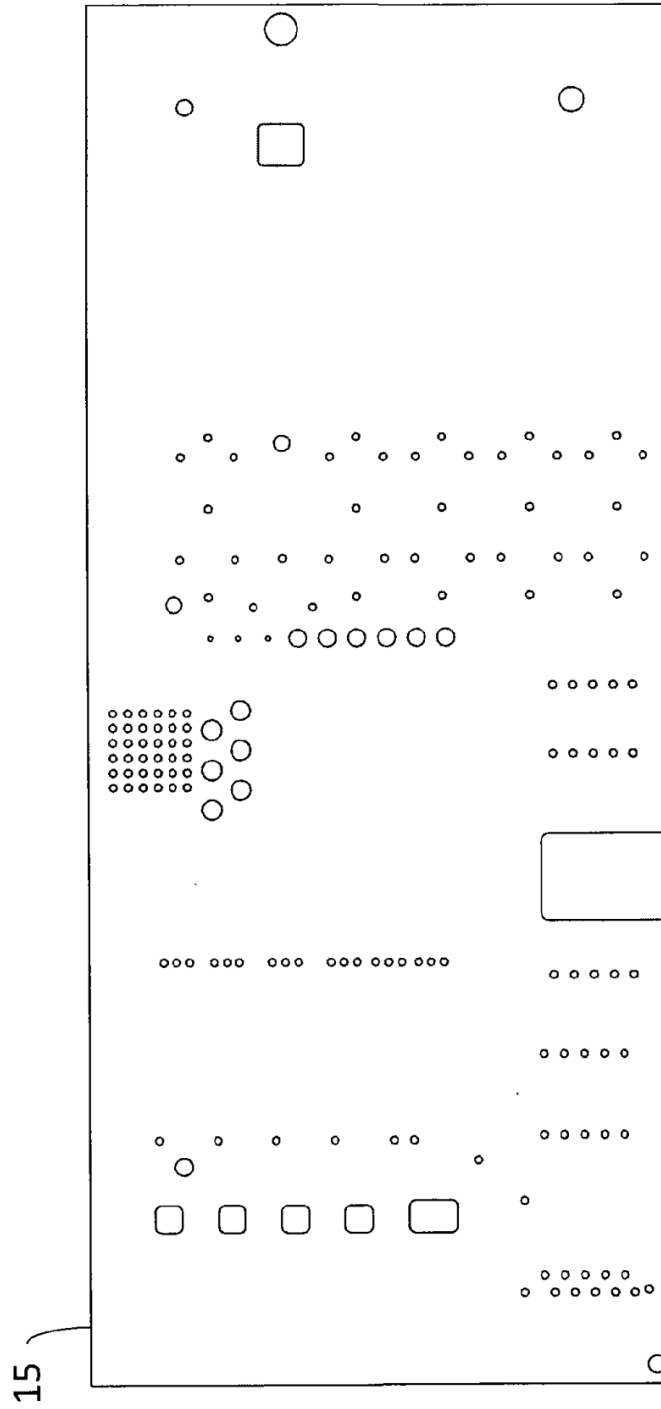


Figura 46

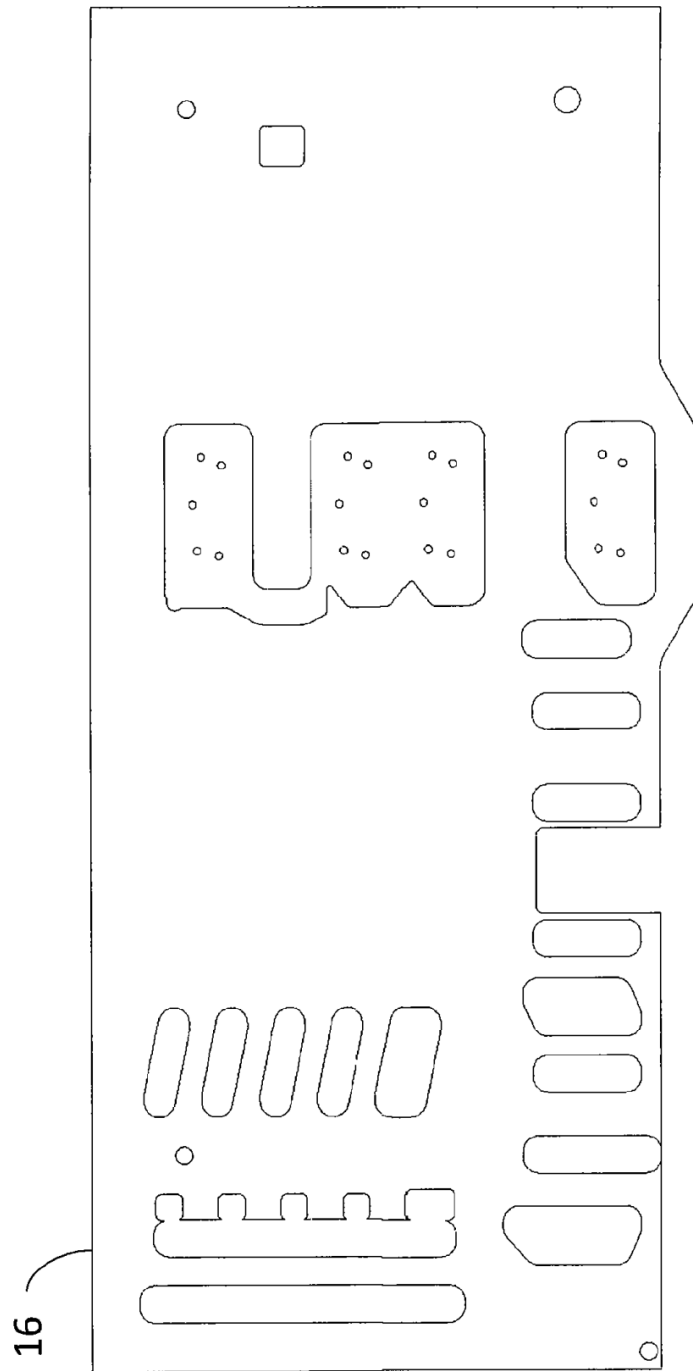


Figura 47

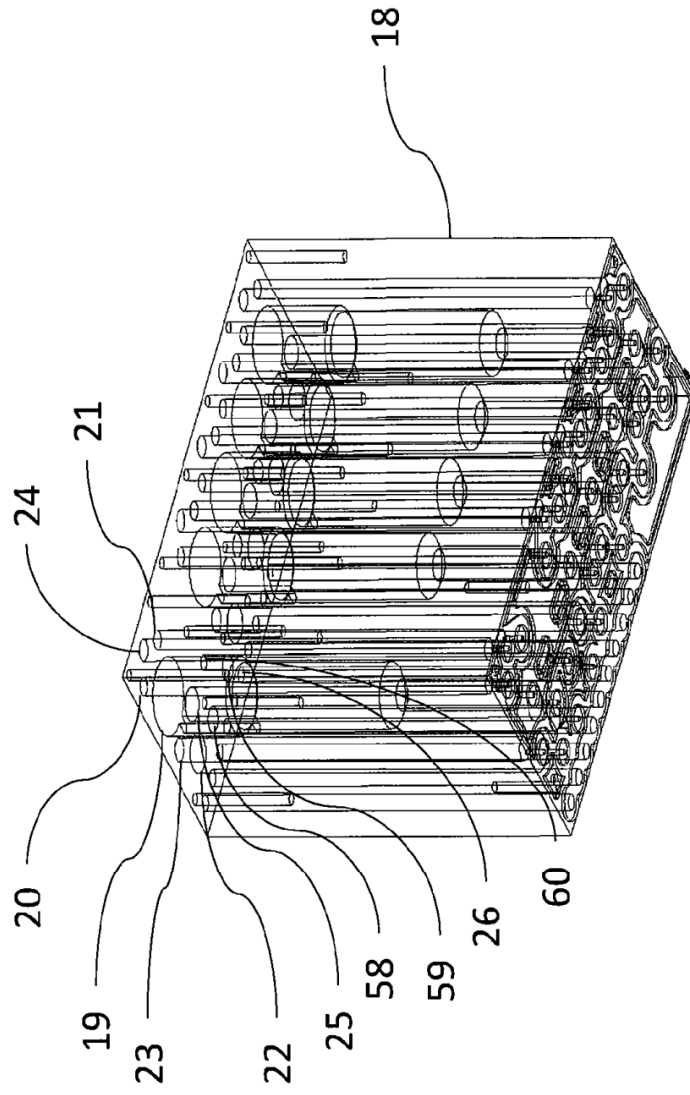


Figura 48

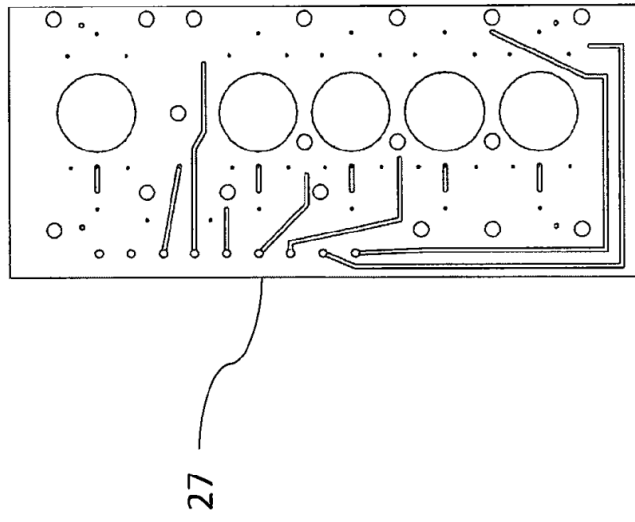


Figura 49

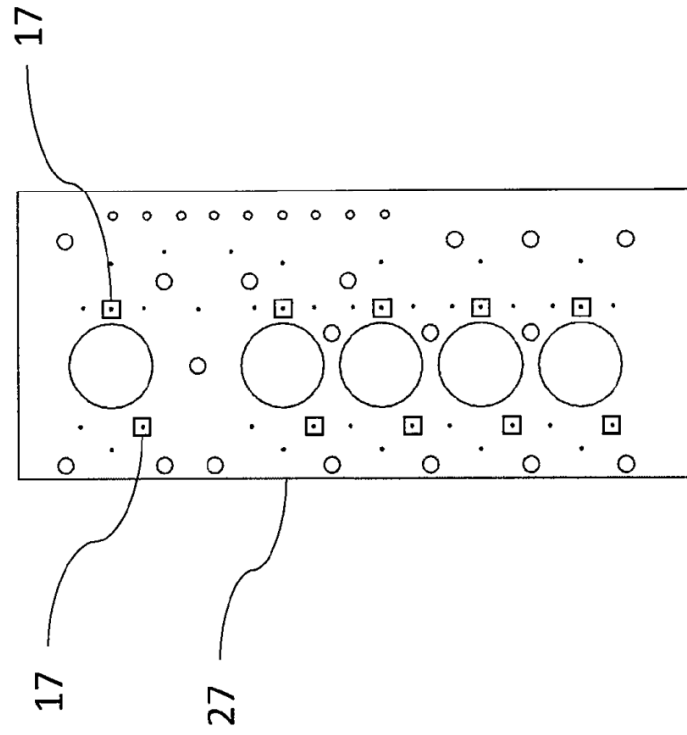


Figura 50

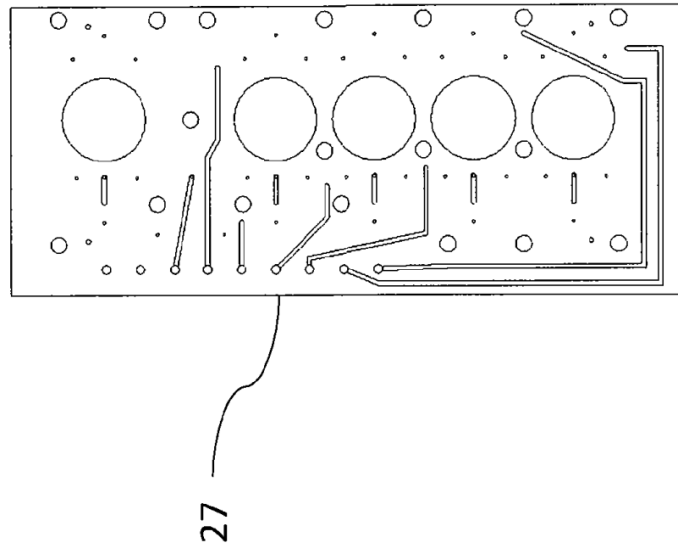


Figura 51

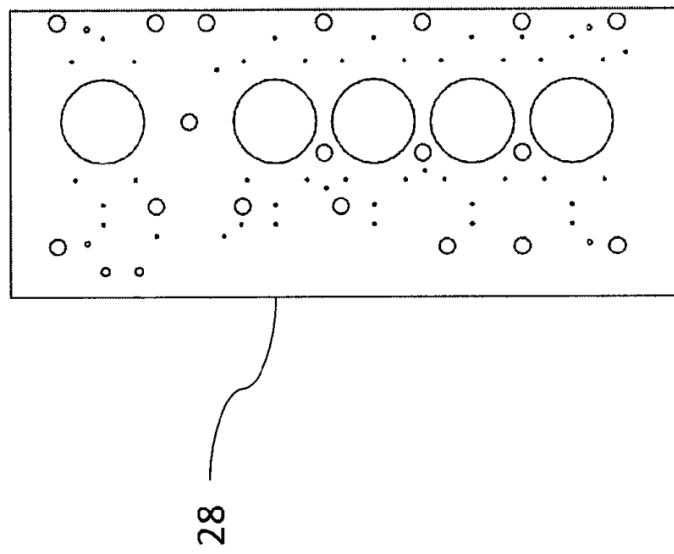


Figura 52

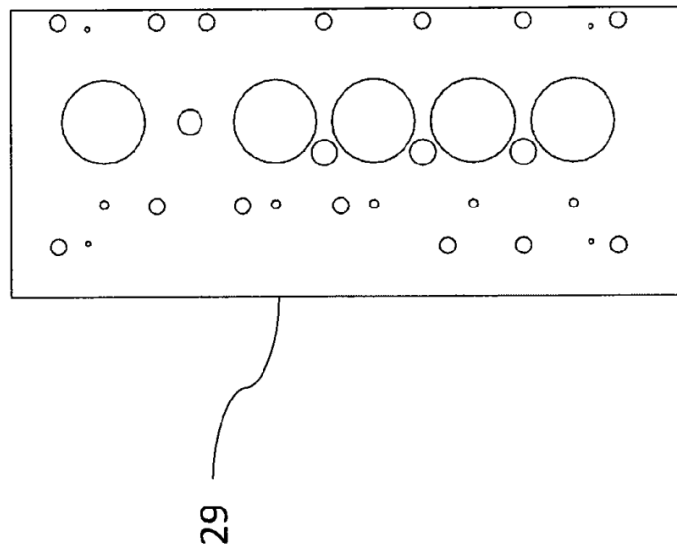


Figura 53

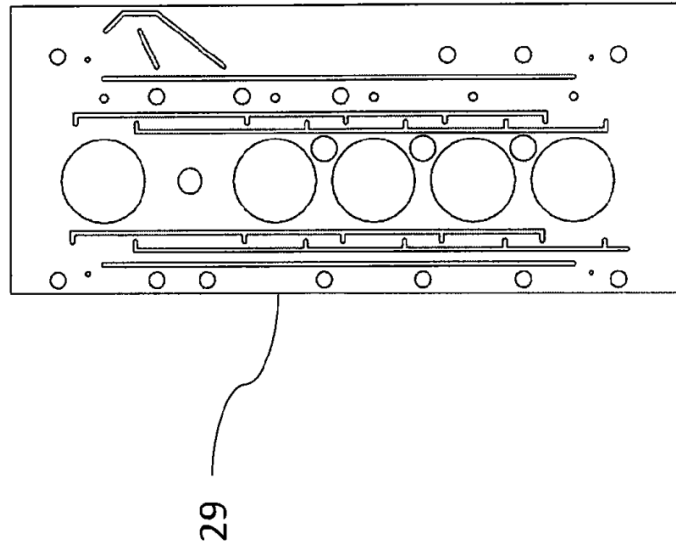


Figura 54

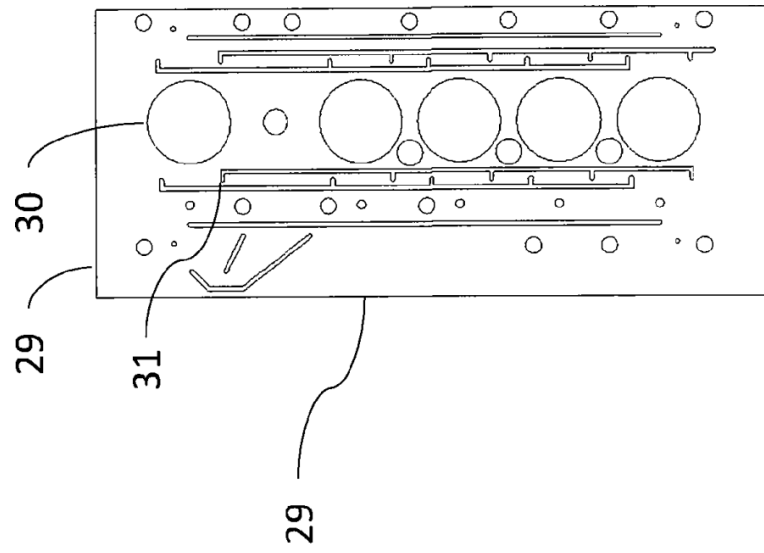


Figura 55

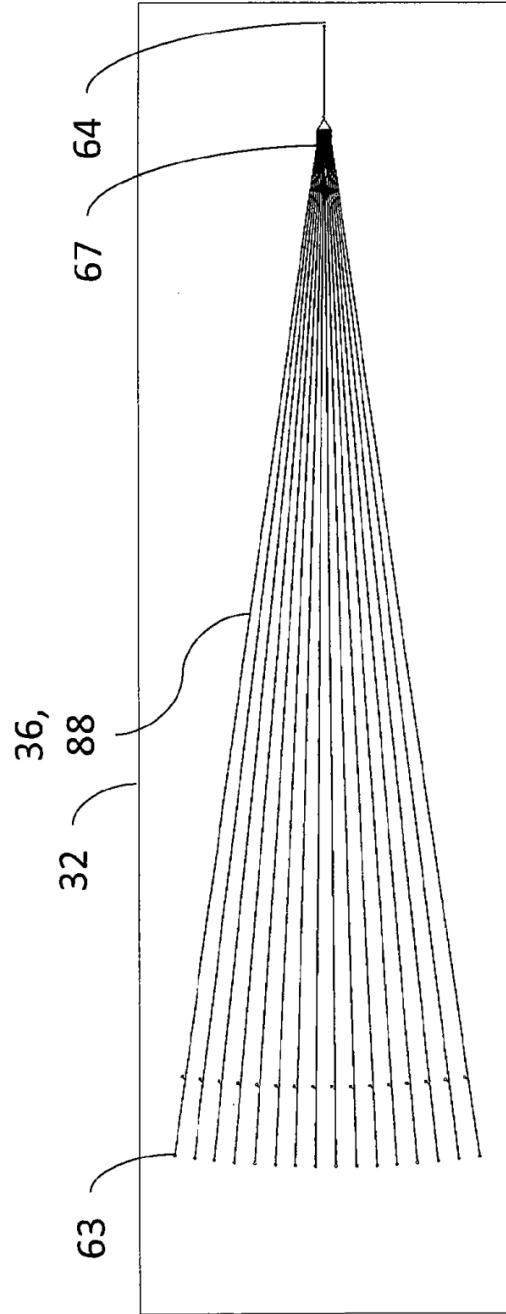


Figura 56

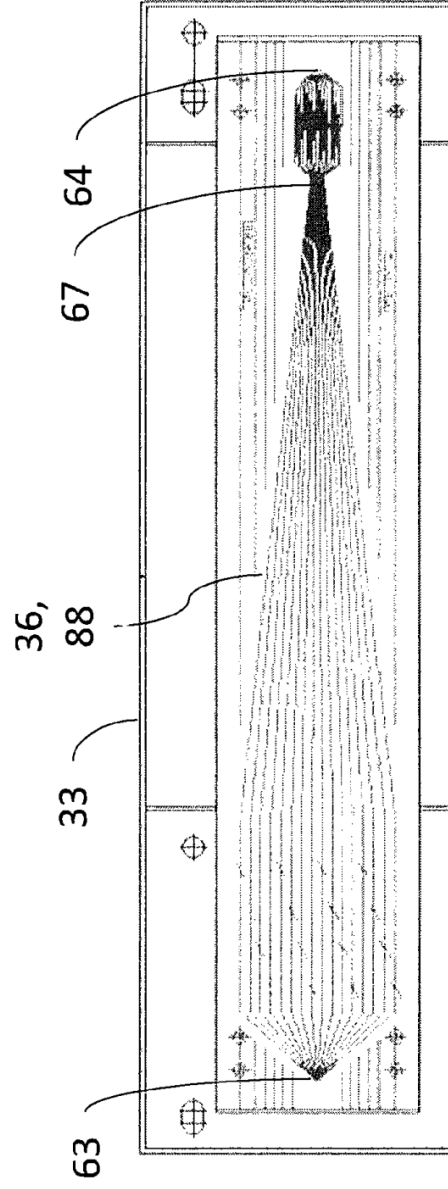


Figura 57

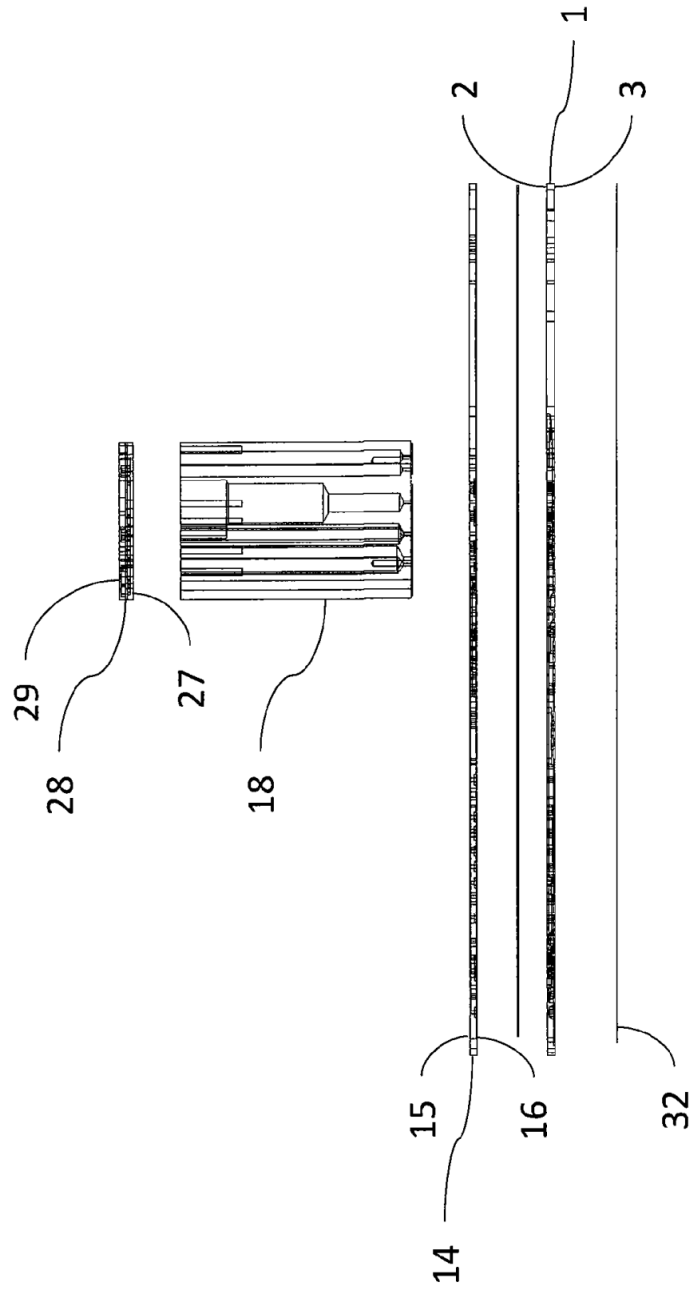


Figura 58

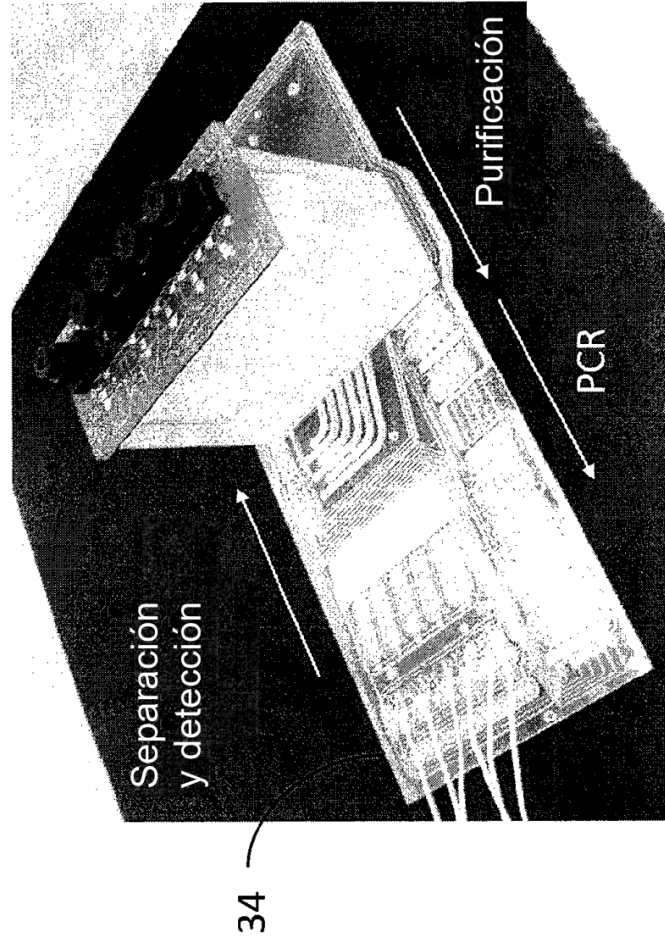


Figura 59

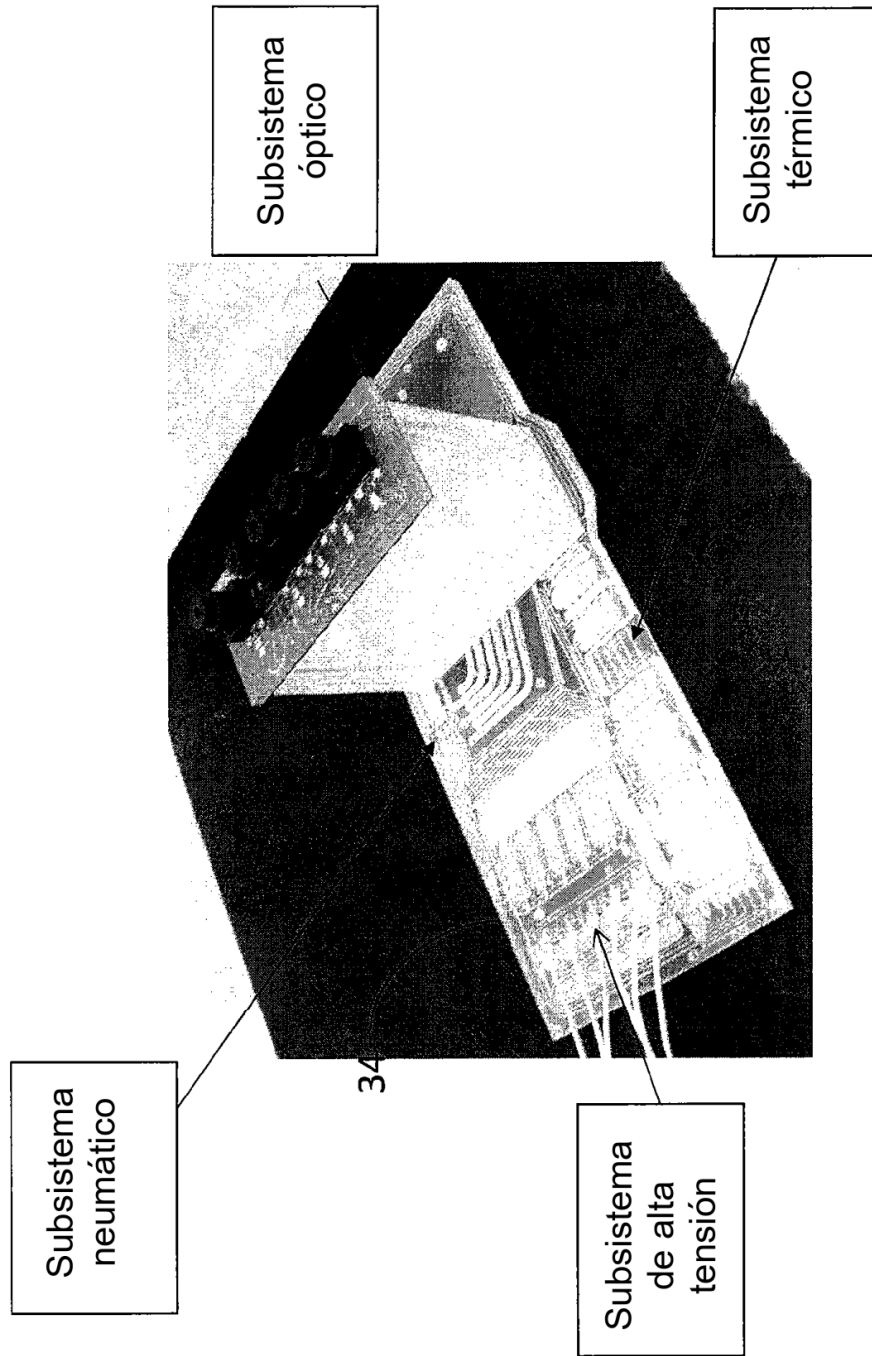


Figura 60

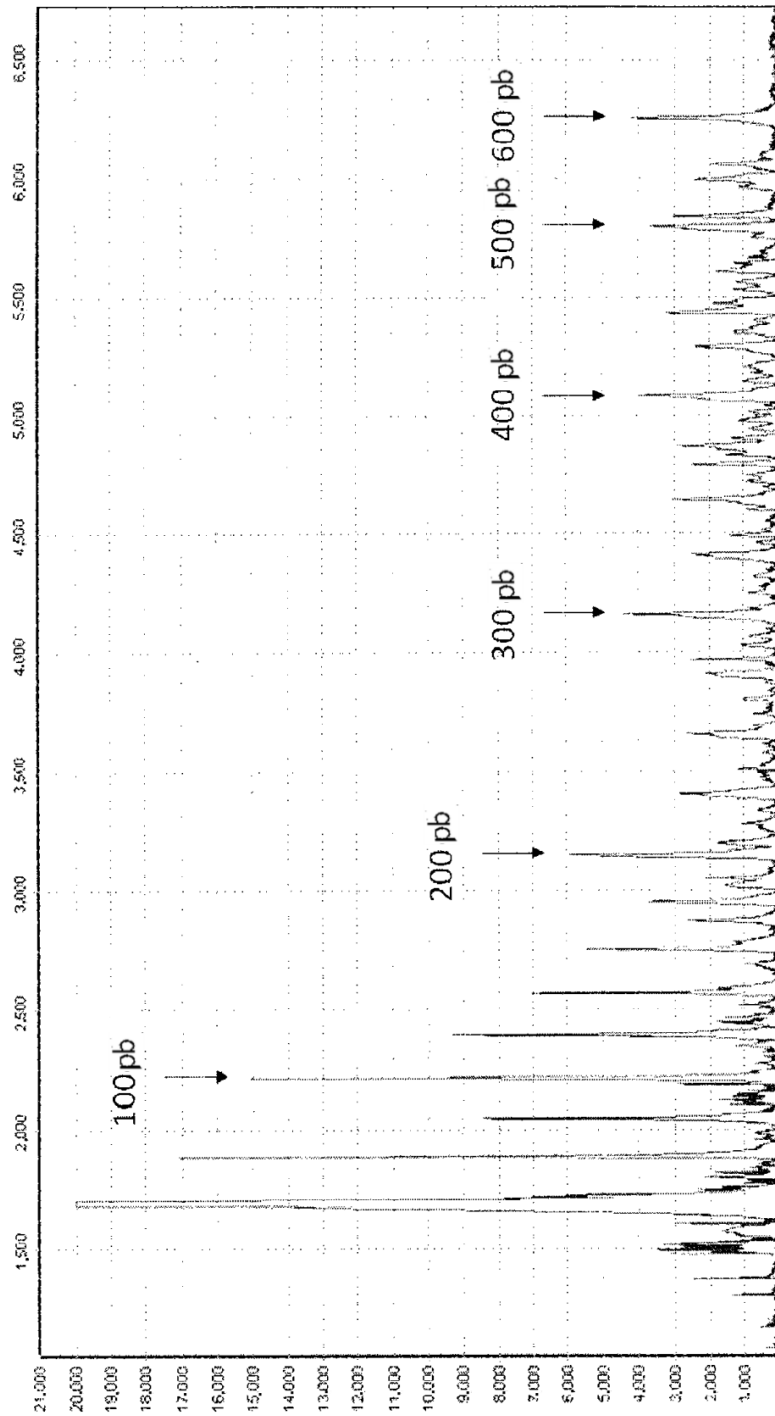


Figura 61

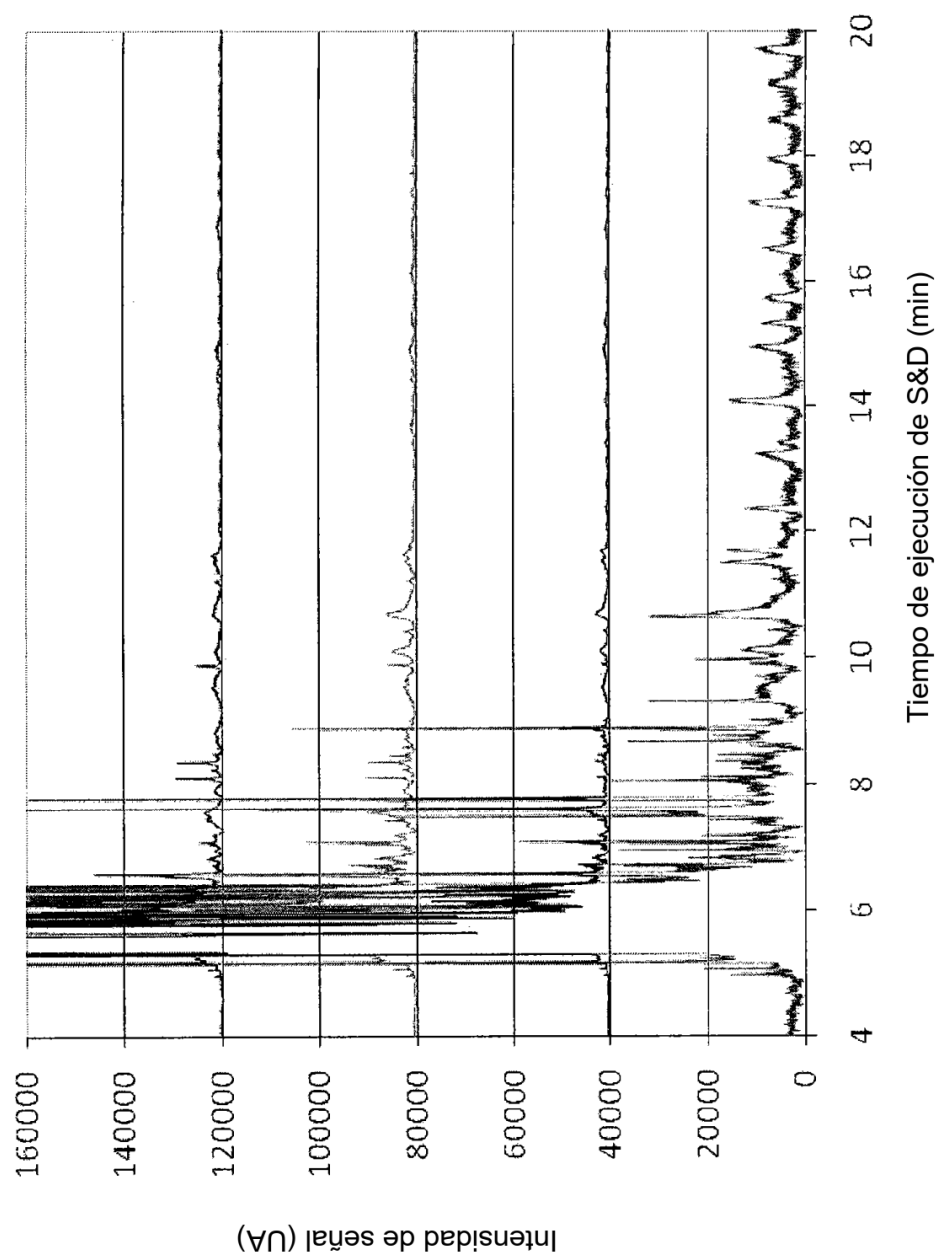


Figura 62

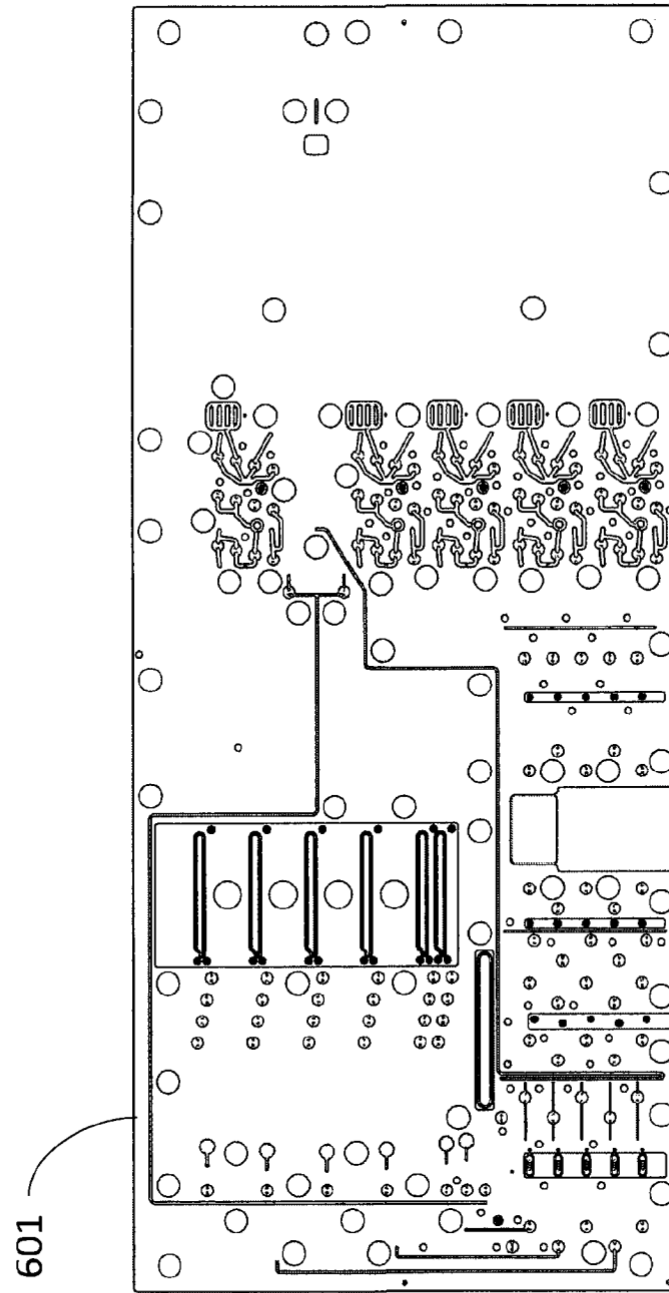


Figura 63

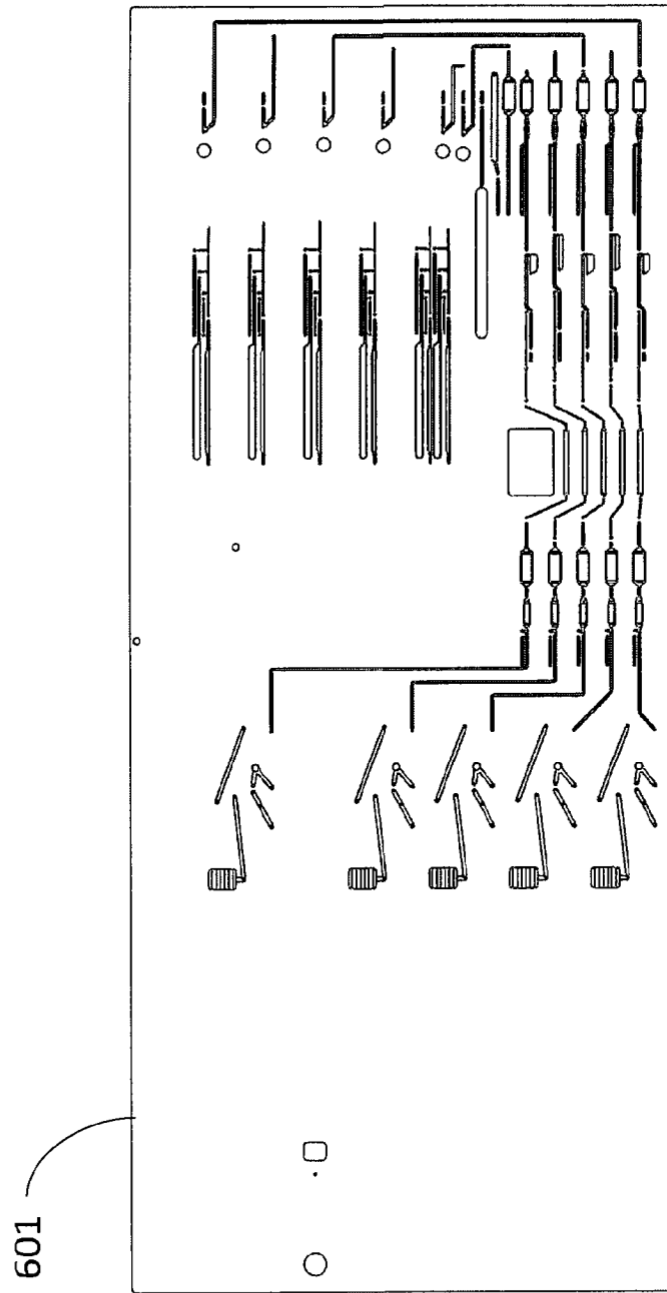


Figura 64

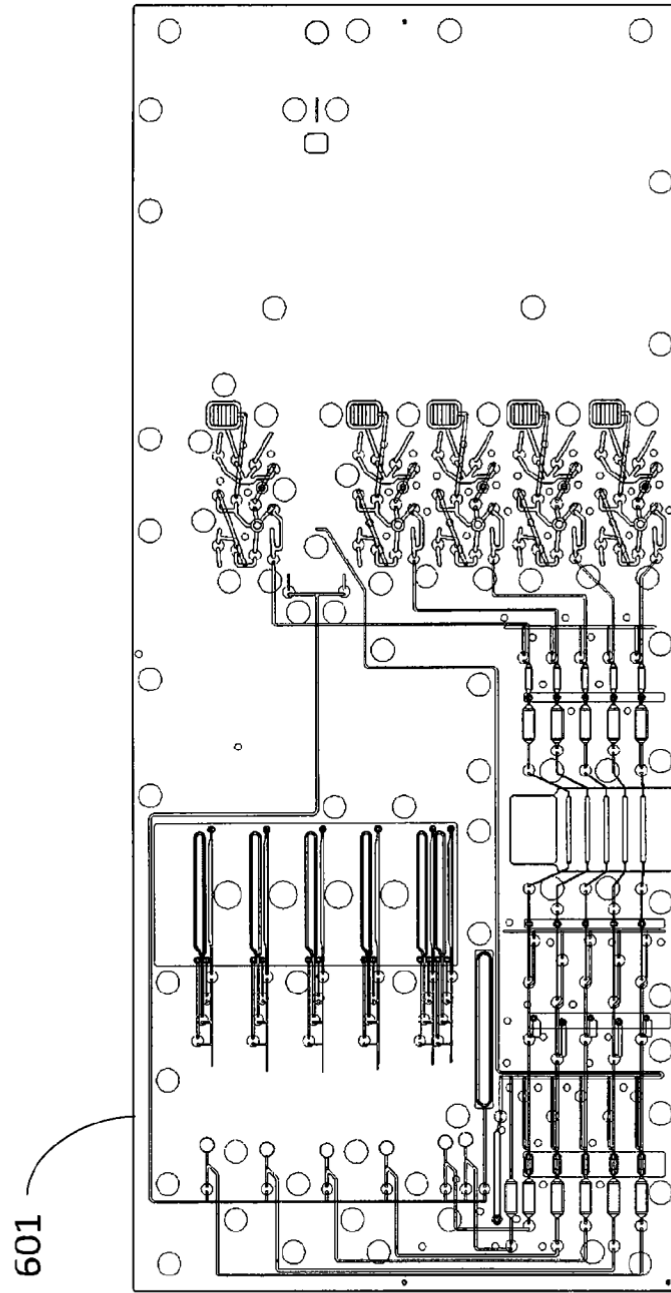


Figura 65

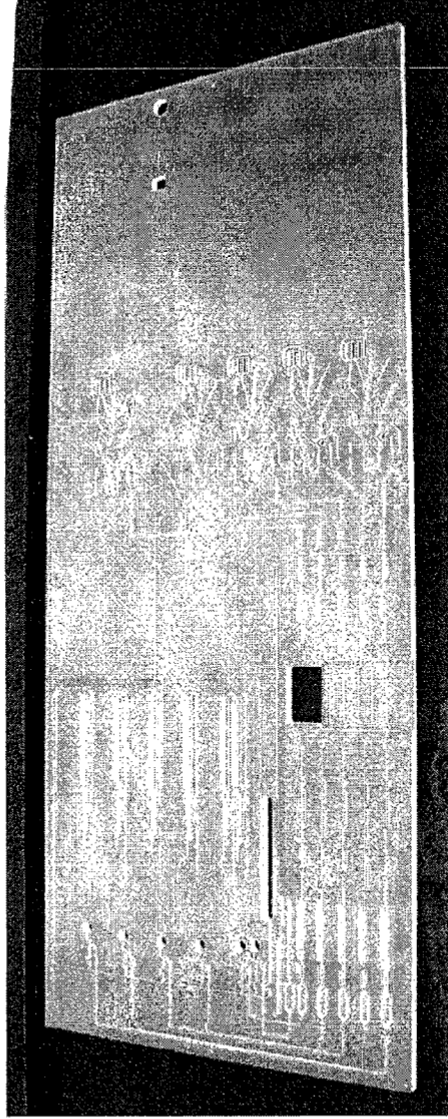


Figura 66

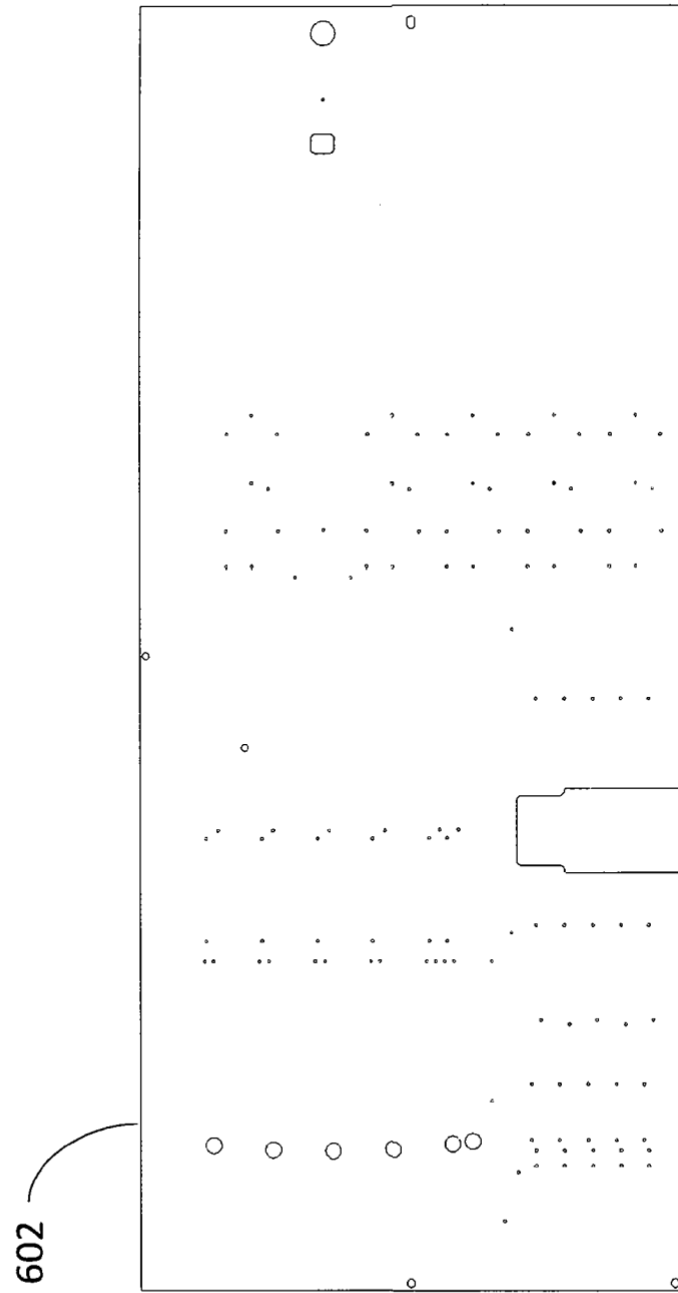


Figura 67

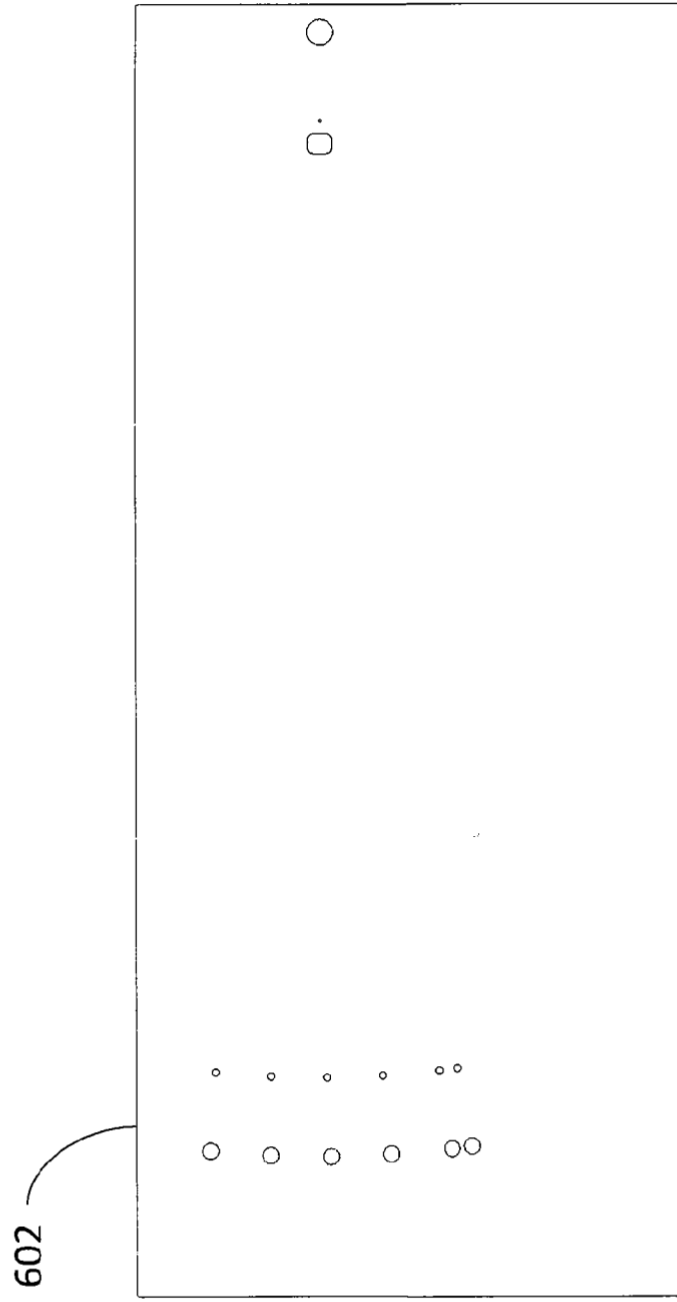


Figura 68

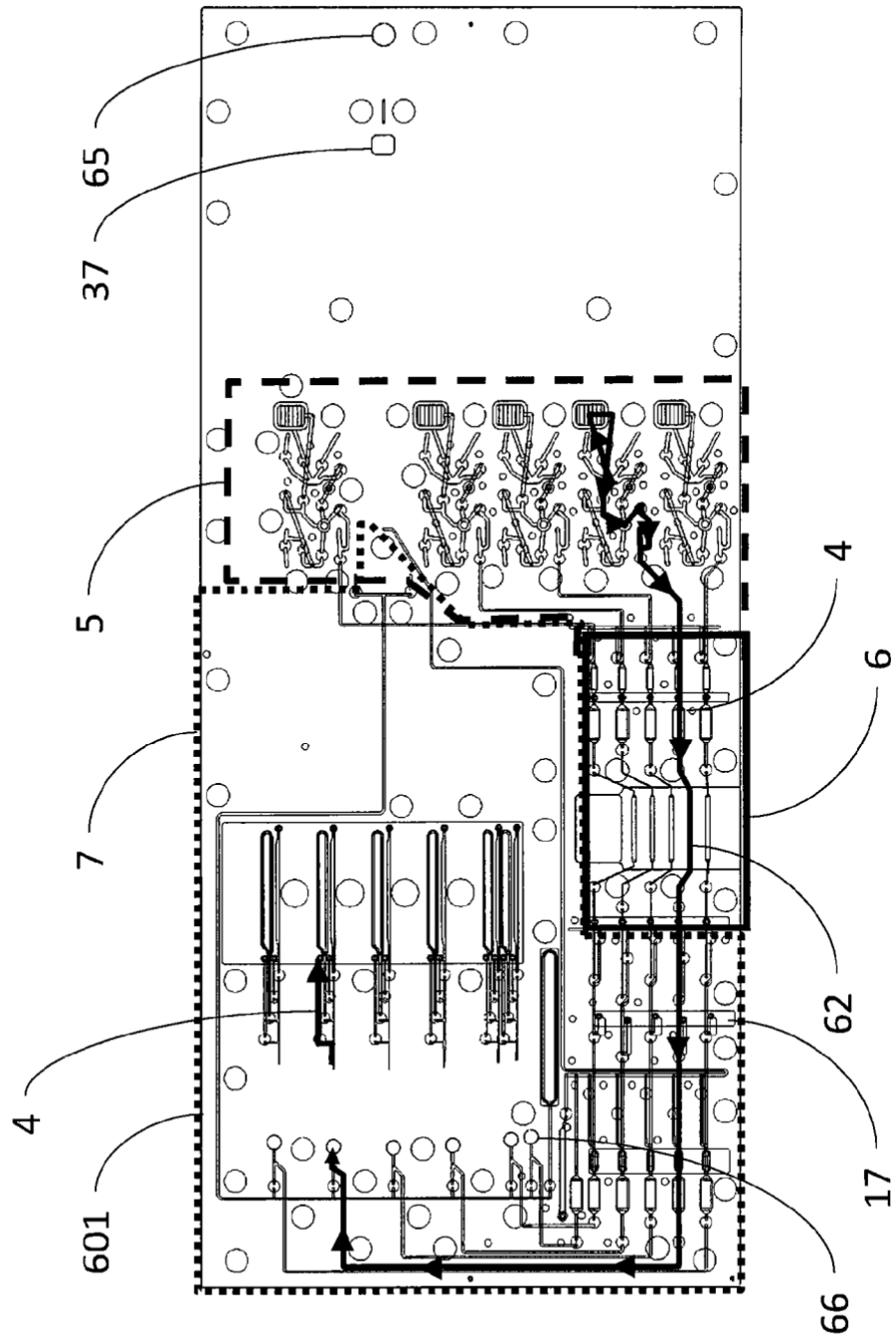


Figura 69

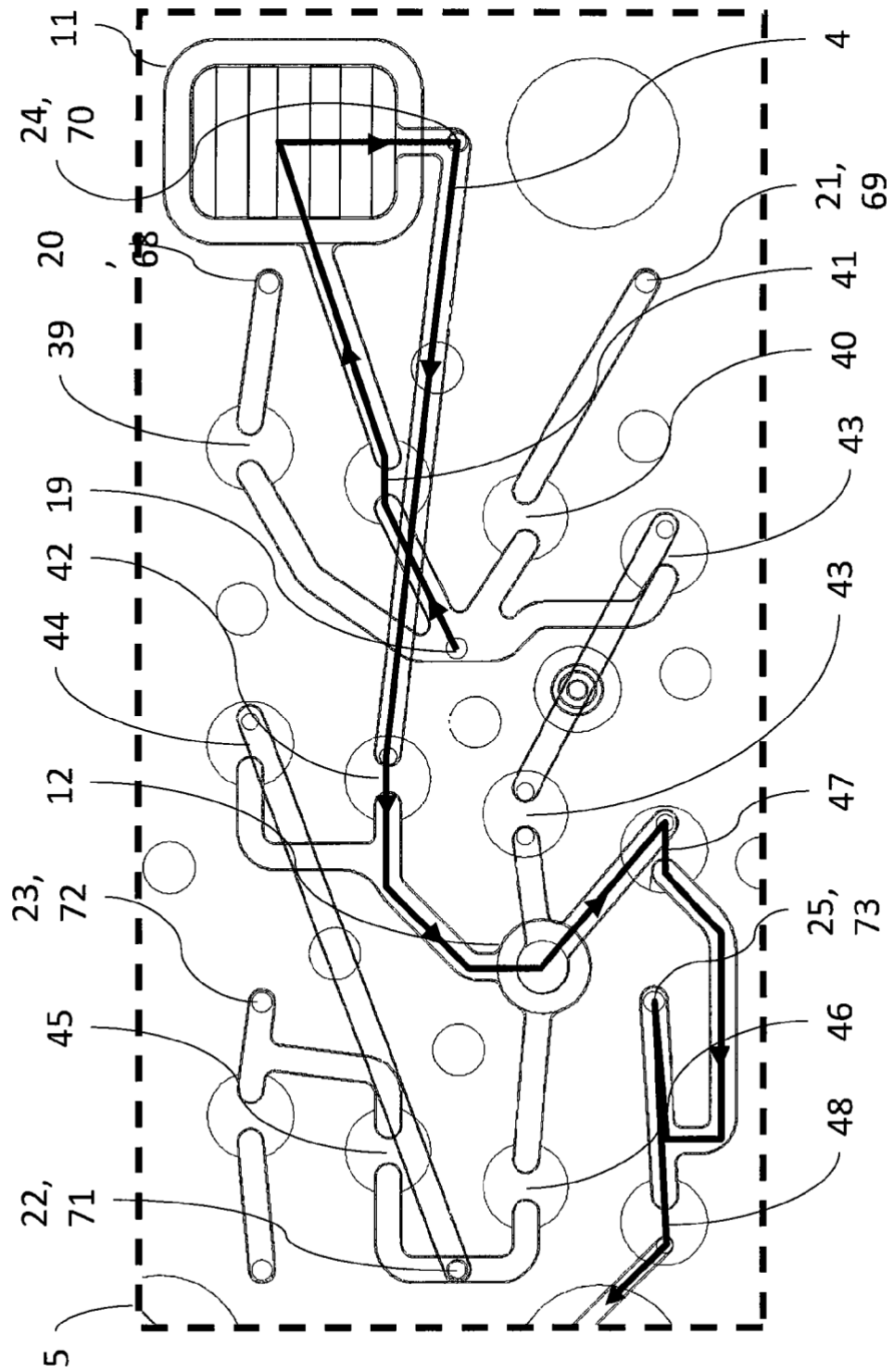


Figura 70

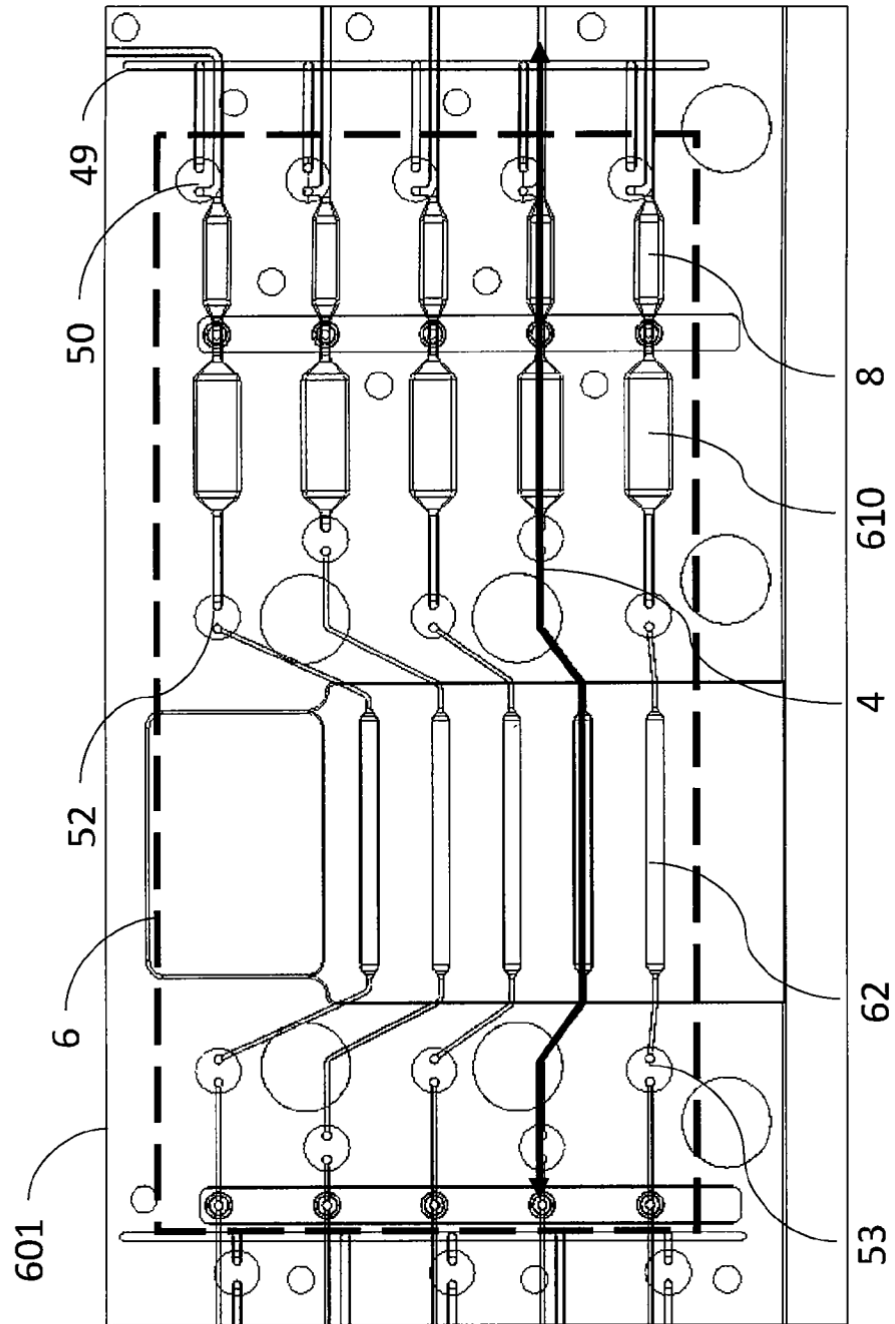


Figura 71

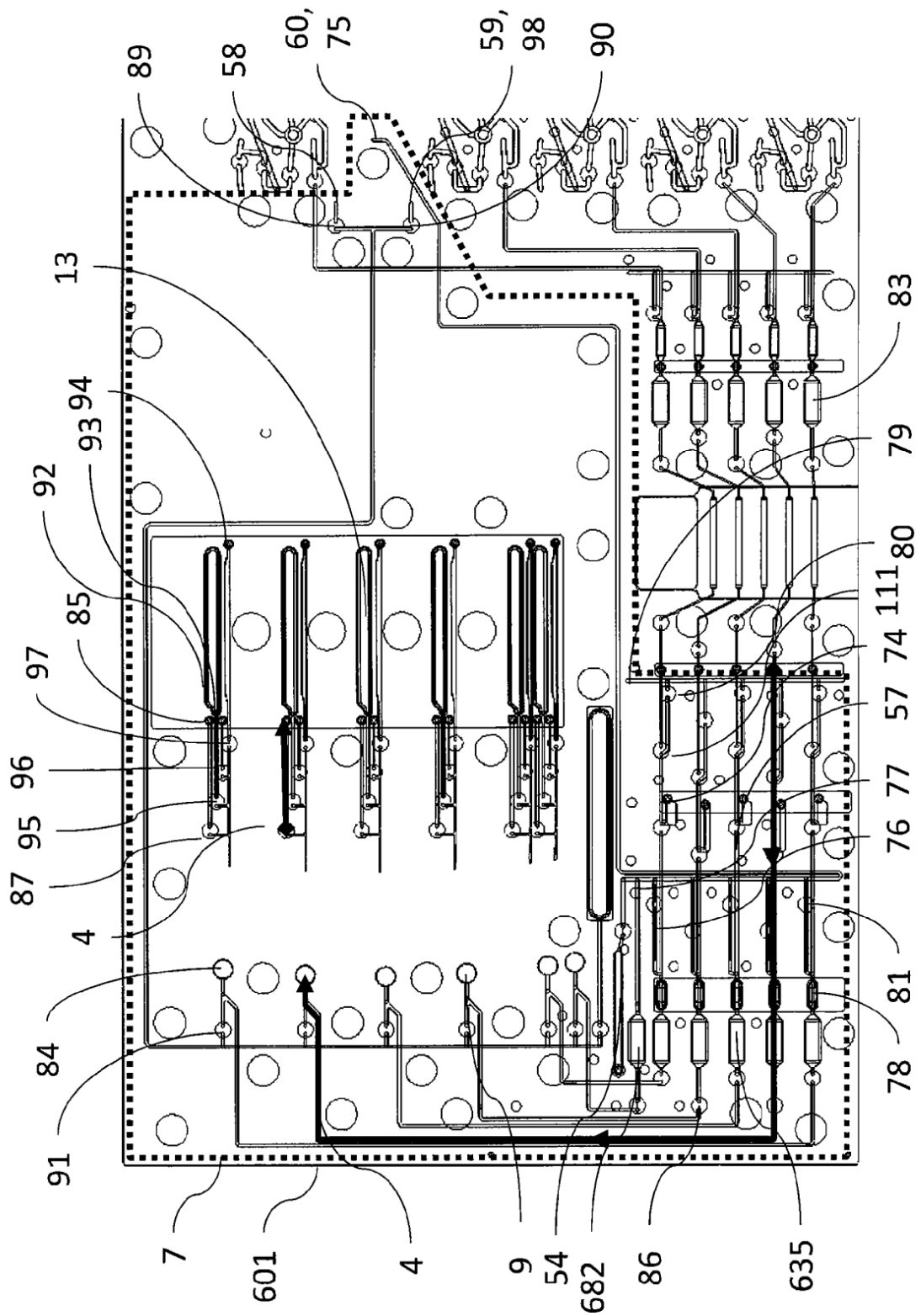
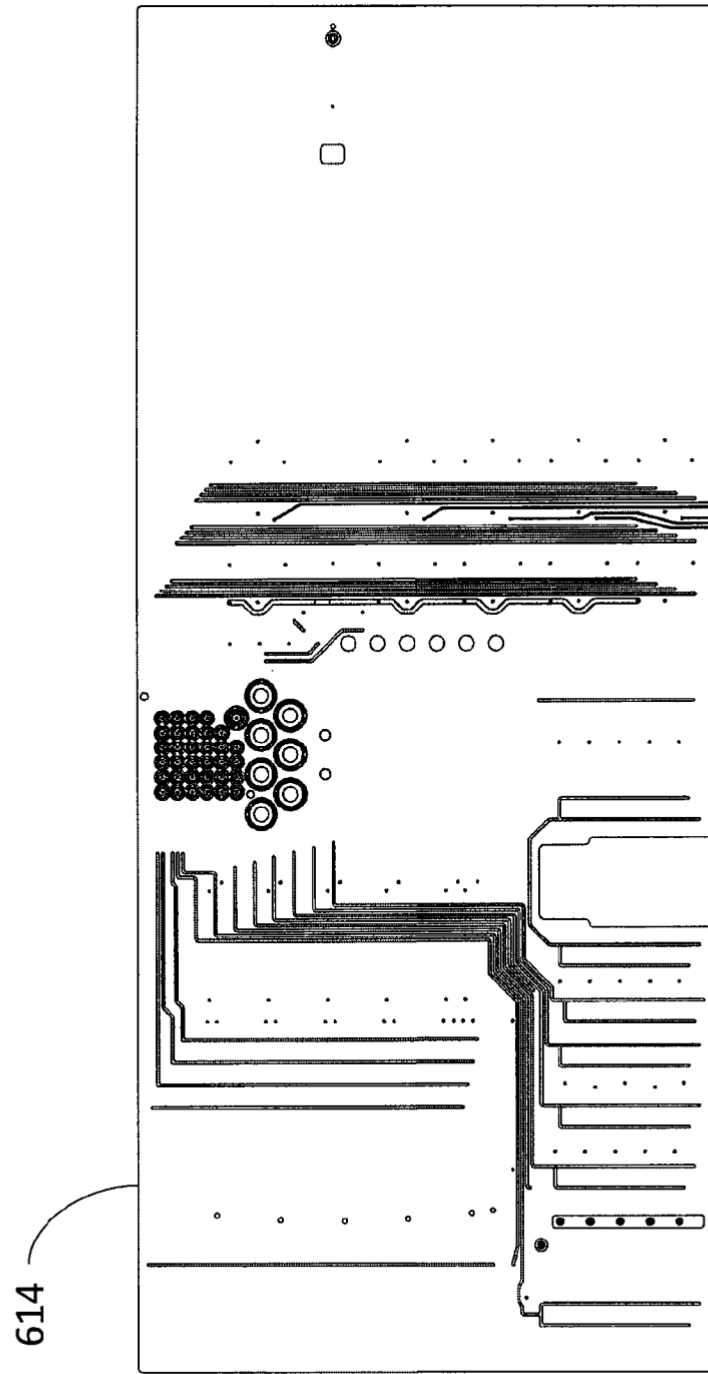


Figura 72



(Placa neumática: 277,62 mm x 117,70 mm x 2,50 mm)

Figura 73

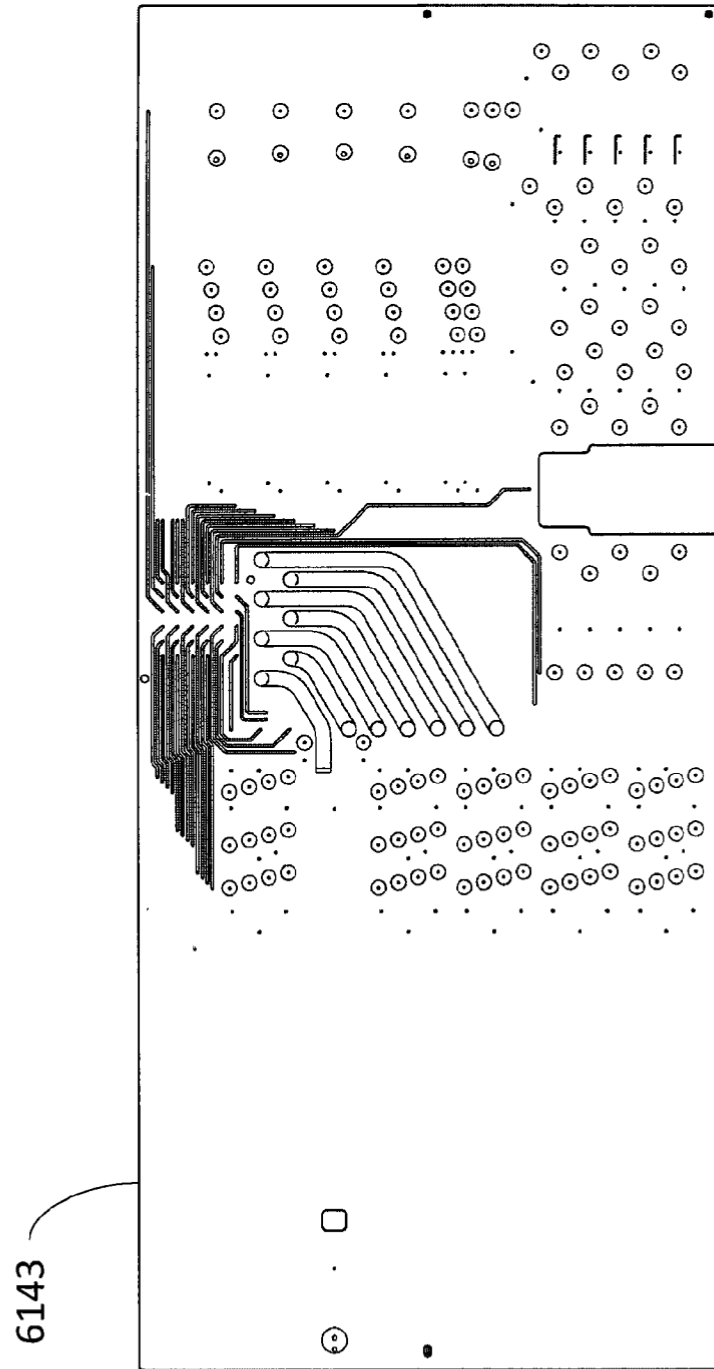


Figura 74

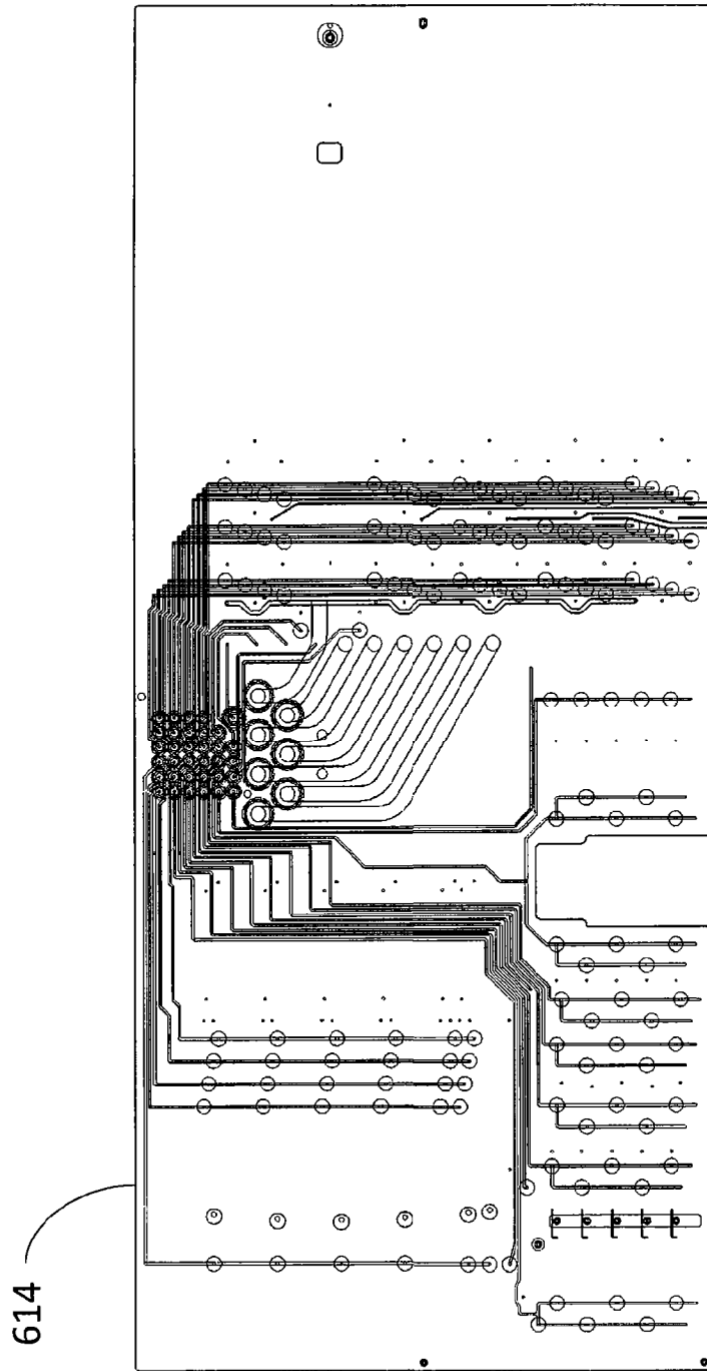


Figura 75

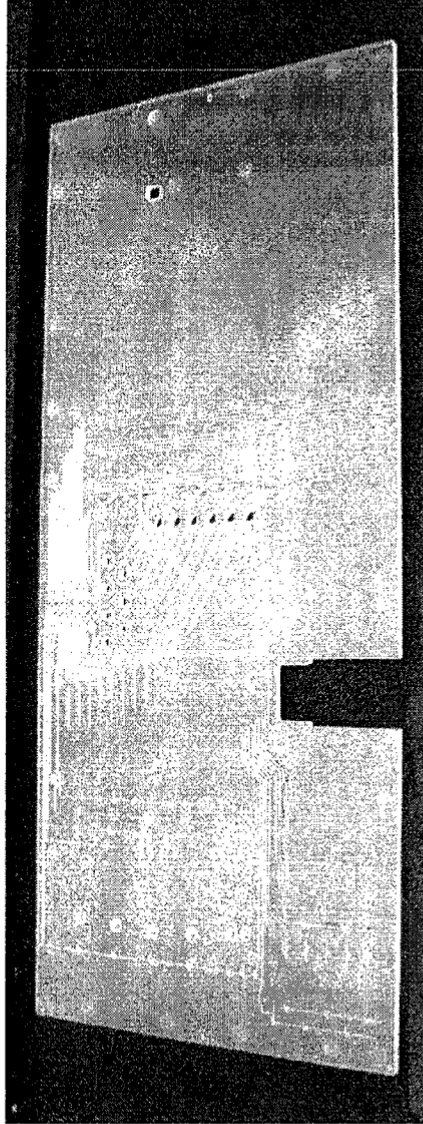


Figura 76

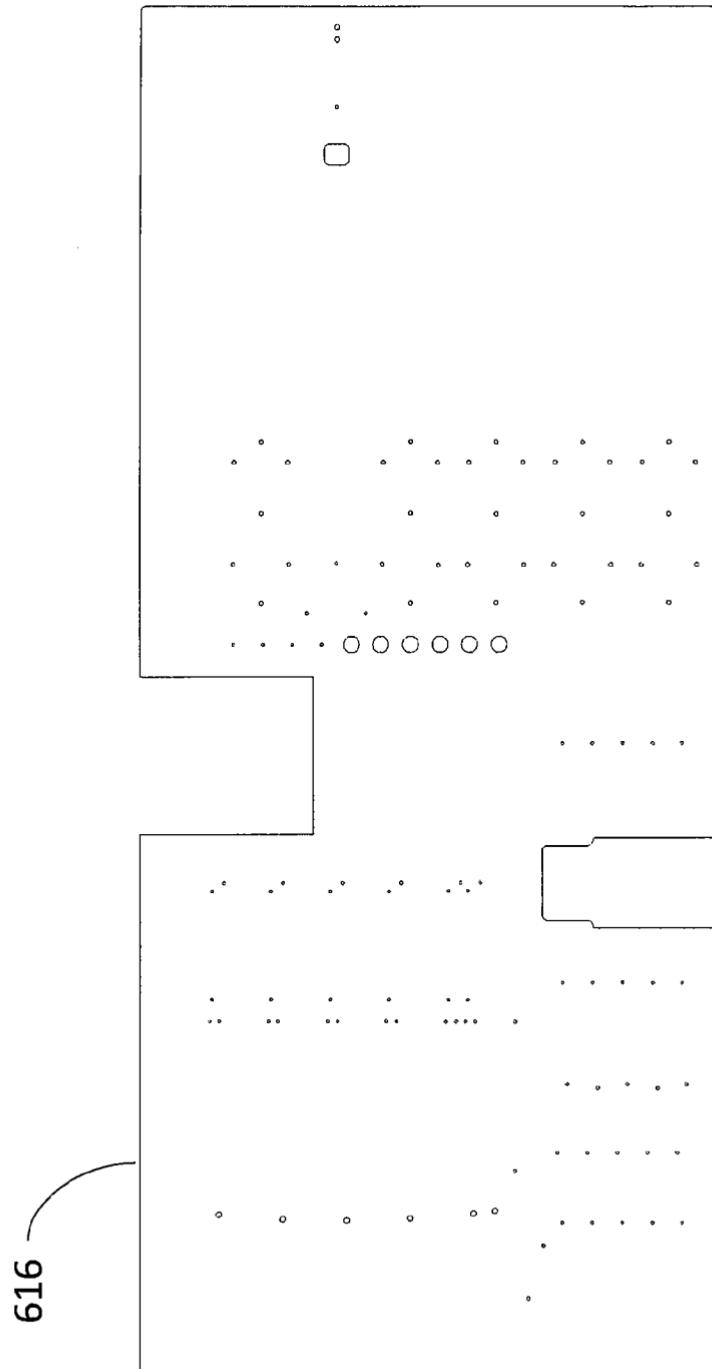


Figura 77

Etapas programadas	Tiempo de retención (s)	Presión de DL6 (psig)	Presión de DL7 (psig)	Estado de V10	Estado de V11
1		0	0	Cerrado	Cerrado
2		0	0	Abierto	Cerrado
3	40	1	0	Abierto	Cerrado
4		0	0	Abierto	Cerrado
5		0	0	Cerrado	Cerrado
6		0	0	Abierto	Cerrado
7		0	0	Abierto	Abierto
8	25	0	2	Abierto	Abierto
9		0	0	Cerrado	Abierto
10		0	0	Cerrado	Cerrado

Figura 78

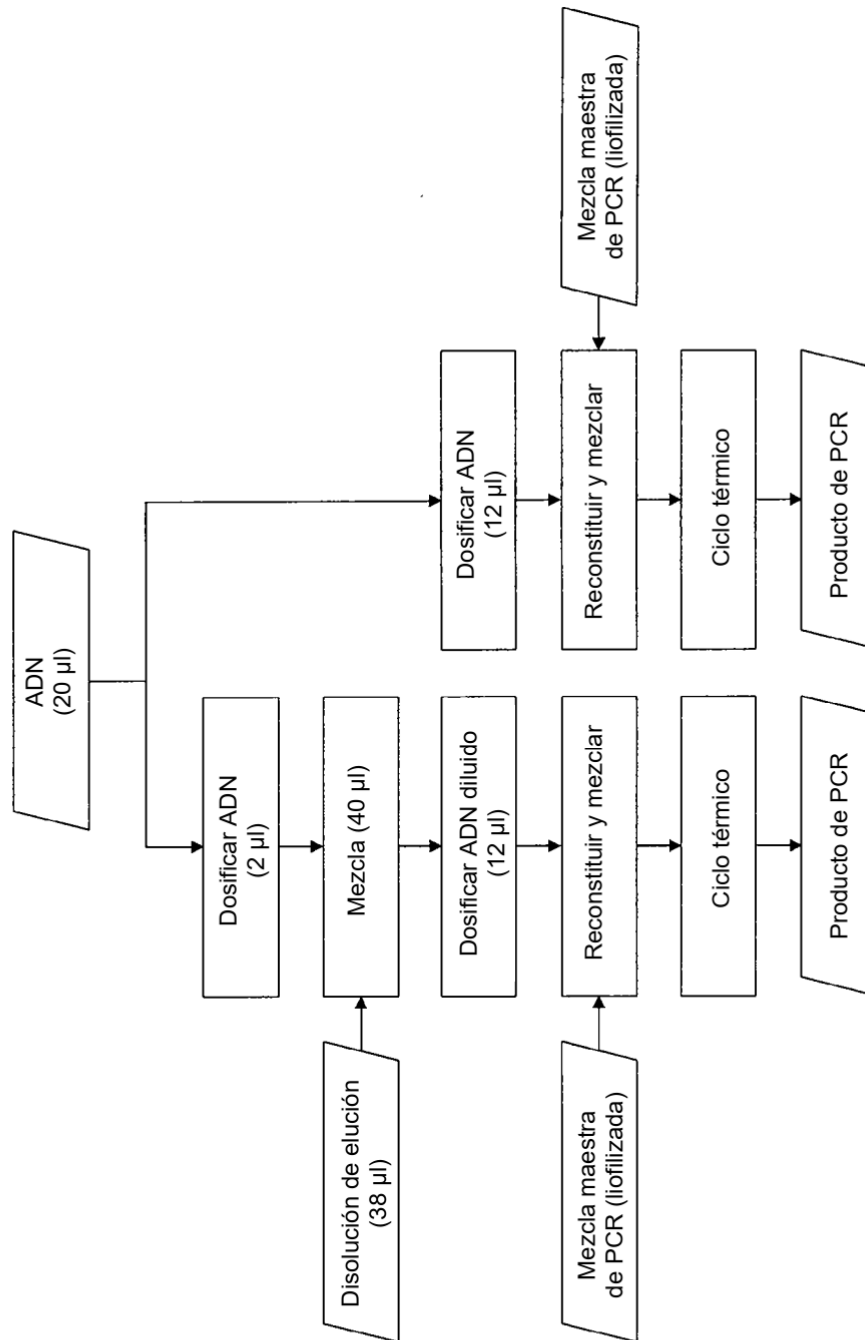


Figura 79

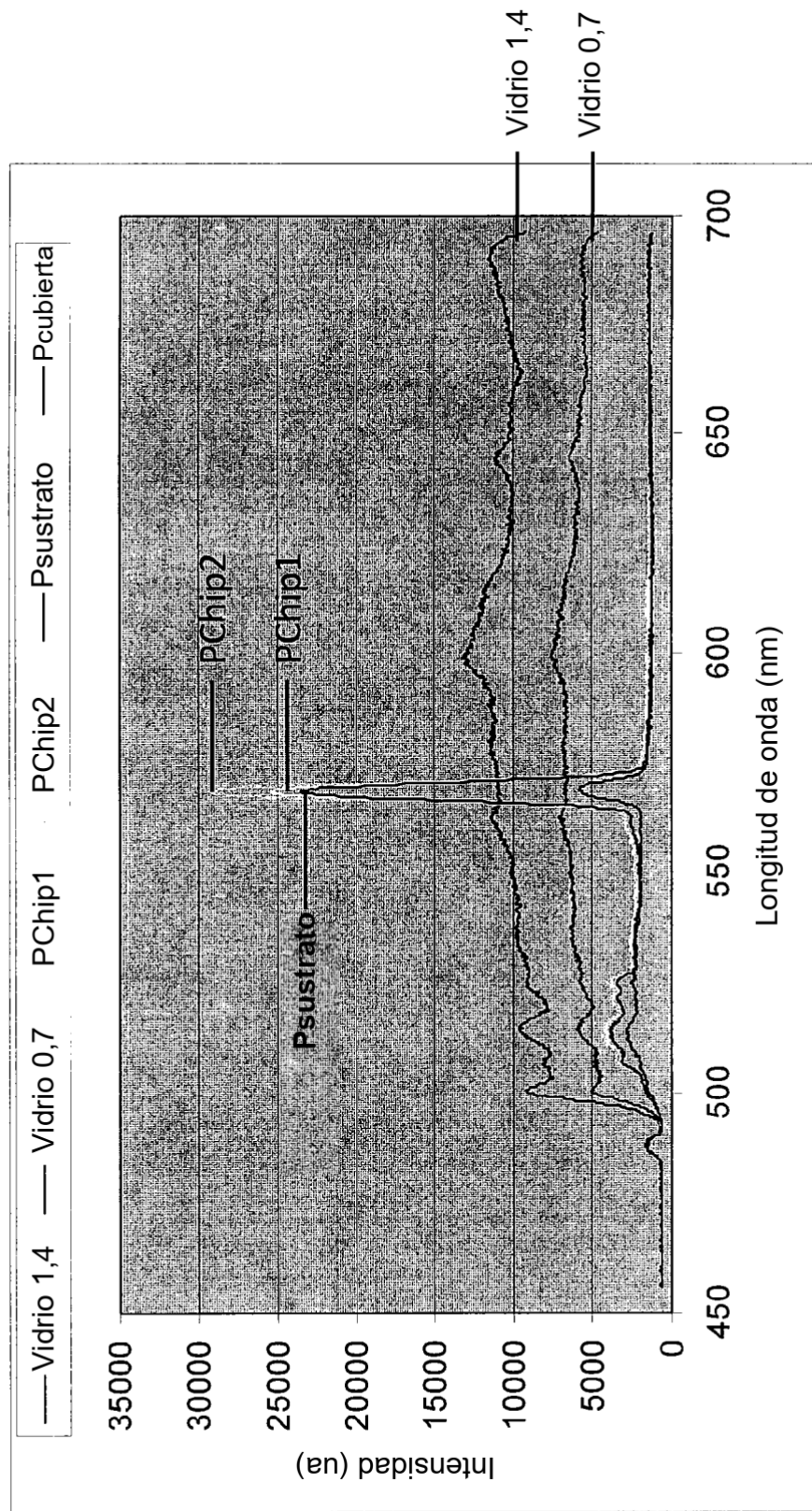


Figura 80

Serie N.º	Sin filtro paso banda			Con filtro paso banda		
	1	2	Promedio	1	2	Promedio
Intensidad de señal de alelo	1426	1615	1520	1323	1149	1236
Ruido entre picos	68	66	67	40	37	39
Señal-ruido	21	25	23	33	31	32