

ITALIAN PATENT OFFICE

Document No.

102012902041162A1

Publication Date

20131012

Applicant

STMICROELECTRONICS S.R.L.

Title

DISPOSITIVO E METODO PER LA PREPARAZIONE DI CAMPIONI BIOLOGICI,
IN PARTICOLARE PER L'ESTRAZIONE DEL DNA, E IL CARICAMENTO IN
POZZETTI PER LA SUCCESSIVA ESECUZIONE DELLA PCR.

DESCRIZIONE

del brevetto per invenzione industriale dal titolo:

"DISPOSITIVO E METODO PER LA PREPARAZIONE DI CAMPIONI BIOLOGICI, IN PARTICOLARE PER L'ESTRAZIONE DEL DNA, E IL CARICAMENTO IN POZZETTI PER LA SUCCESSIVA ESECUZIONE DELLA PCR"

di STMICROELECTRONICS S.R.L.

di nazionalità italiana

con sede: VIA C. OLIVETTI, 2

AGRATE BRIANZA (MB)

Inventori: MASTROMATTEO Ubaldo, VILLA Flavio Francesco,
BARLOCCHI Gabriele

* * *

La presente invenzione riguarda un dispositivo ed un metodo per la preparazione di campioni biologici in modo da rendere il campione preparato idoneo ad essere utilizzato in successivi processi di analisi.

Un esempio di preparazione di un campione consiste nell'estrazione di sequenze di materiale biologico, quale DNA, e successiva purificazione (in gergo "sample preparation"), ad esempio da sangue intero, per l'utilizzo in successivi processi di analisi quali ad esempio RT-PCR (dall'inglese Real Time Polymerase Chain Reaction - Reazione a catena della polimerasi in tempo reale), elettroforesi, genotipo ed altri.

La preparazione del campione biologico consistente nell'estrazione del DNA e la successiva purificazione, detta anche in gergo "sample preparation" è il punto di partenza di numerosi processi di analisi del DNA, quali la RT-PCR, l'elettroforesi, il genotipo ecc....

Attualmente la sample preparation può essere effettuata utilizzando appositi kit disponibili in commercio, che vengono operati manualmente attuando un particolare metodo. La fig. 1 illustra il cosiddetto "spin column method" che è fra le metodologie più usate per la sample preparation. Con riferimento alla fig. 1, il processo posto in essere da questo metodo si compone di quattro fasi.

In una prima fase, detta di pretrattamento, il campione biologico selezionato, da cui estrarre il DNA, ad esempio sangue intero, viene sottoposto ad un trattamento di lisi cellulare consistente nella dissoluzione della cellula mediante distruzione della membrana cellulare. La lisi viene eseguita ponendo il campione biologico in una soluzione ipotonica. Successivamente alla lisi, attraverso l'utilizzo di appositi enzimi quali la proteinasi K, si effettua una digestione delle proteine contaminanti presenti come effetto della lisi.

La seconda fase, detta di cattura del DNA, consiste nella separazione e nel recupero dell'acido nucleico dalla soluzione contenente il risultato della lisi. Uno fra i me-

todi più recenti consiste nell'utilizzo di una matrice di gel di silice in presenza di sali caotropici, sulla cui superficie il DNA viene adsorbito e catturato.

Nella terza fase, detta di lavaggio, utilizzando una opportuna soluzione quale ad esempio acqua distillata, la matrice di gel viene lavata allo scopo di eliminare residui interferenti quali proteine e lipidi.

Nella fase quattro, detta di eluizione, la matrice di gel di silice, sulla cui superficie è stato catturato il DNA, viene eluita utilizzando una soluzione acquosa a bassa concentrazione salina. Attraverso questo trattamento, il DNA precedentemente catturato sulla superficie della matrice di gel viene asportato e reso disponibile in soluzione all'interno della provetta. Il campione preparato è pronto per essere utilizzato nella "downstream application" per esempio la RT-PCR.

Per eseguire la RT-PCR, mediante l'utilizzo di una pipetta, il campione preparato deve successivamente essere raccolto e trasferito nei pozzetti ricavati in una piastrina di silicio alloggiata su di una cartuccia usa e getta. Successivamente questa cartuccia viene inserita all'interno di un termociclatore con un rivelatore a fluorescenza per effettuare l'analisi del DNA.

Tutte le fasi precedentemente descritte relative alla preparazione del campione e al caricamento del campione

preparato nei pozzetti ricavati in una piastrina di silicio sono eseguite manualmente utilizzando i dispositivi in dotazione al kit (provette, pipette, tamponi ecc..). La sequenza delle varie fasi coinvolge la movimentazione di un numero elevato di dispositivi e il trasferimento di liquidi nella transizione da una fase all'altra del metodo.

Dato l'elevato numero di manovre e di dispositivi coinvolti e data la precisione richiesta nelle manovre, che vengono eseguite a mano, il metodo risulta particolarmente lento, complesso nella sua attuazione, esposto ad errori di esecuzione accidentali e a contaminazioni da parte dell'ambiente circostante, risultando complessivamente poco robusto e poco affidabile in relazione alla qualità del risultato finale.

Il metodo su esposto risulta inoltre poco efficace in termini di resa economica, richiedendo l'utilizzo di quantitativi elevati di costosi reagenti. Infine può essere eseguito soltanto da personale altamente specializzato, limitandone l'uso al solo ambiente ospedaliero e/o laboratoristico.

Scopo della presente invenzione è realizzare un dispositivo ed un metodo associato per la preparazione di un campione contenente materiale biologico e per il caricamento in pozzetti ricavati all'interno di una piastrina di silicio, idoneo ad essere in seguito utilizzato in un processo

di analisi. Il dispositivo e il metodo associato per la preparazione di un campione contenente materiale biologico devono essere semplici da attuare, consentire elevata rapidità nella preparazione del campione e quindi ridotti tempi di analisi, avere costi ridotti e robustezza in termini di qualità del risultato finale, e infine essere utilizzabili da personale non necessariamente altamente qualificato. La fase di caricamento nei pozzetti deve essere integrata nel dispositivo.

In base alla presente invenzione sono forniti un dispositivo, un apparecchio ed un metodo per la preparazione di un campione contenente materiale biologico, come riportati nelle rivendicazioni 1, 17 e 18, rispettivamente.

Per meglio comprendere l'invenzione ed apprezzarne i vantaggi, di seguito verranno descritte alcune sue forme di realizzazione esemplificative non limitative, facendo riferimento alle figure annesse, in cui:

- la fig. 1 illustra il metodo dell'arte nota noto come "spin column method" per la preparazione di un campione, in particolare per la estrazione del DNA e purificazione del DNA;

- la fig. 2 mostra una sezione trasversale verticale di una prima forma di realizzazione di un dispositivo per la preparazione di un campione contenente materiale biologico;

- le fig. 3-8 sono sezioni trasversali verticali del dispositivo di fig. 2 durante successive fasi del metodo;
- la fig. 9 è un diagramma di flusso del metodo per la preparazione del campione;
- la fig. 10 è una sezione in pianta di un'altra forma di realizzazione di un dispositivo per la preparazione di un campione contenente materiale biologico;
- la fig. 11 è una vista prospettica di un'altra forma di realizzazione ancora del dispositivo per la preparazione del campione di fig. 10;
- la fig. 12 rappresenta (parzialmente) la sezione trasversale verticale di una ulteriore forma di realizzazione del presente dispositivo; e
- la fig. 13 mostra un apparecchio per l'esecuzione di una analisi biologica.

La fig. 2 illustra una forma di realizzazione di un dispositivo 1000 del tipo usa e getta per la preparazione di un campione contenente materiale biologico, in particolare per l'estrazione del DNA. Il dispositivo 1000 comprende un corpo 1 per la movimentazione dei fluidi e una cartuccia 2 per la RT-PCR (dall'inglese Real Time Polymerase Chain Reaction - Reazione a catena della polimerasi in tempo reale). Guarnizioni 35, ad esempio del tipo ad anello (OR-ring) sono disposte fra il corpo 1 e la cartuccia 2 per garantire la tenuta e prevenire perdite.

Ad esempio, il corpo 1 può avere forma parallelepipedica, di $5 \times 4 \times 3 \text{ cm}^3$, in modo da avere un volume totale complessivo non superiore a 60 cm^3 .

La cartuccia 2 a sua volta comprende un supporto 17, ad esempio di materiale plastico del tipo usato nella produzione di circuiti stampati, e una piastrina 16, ad es. di silicio, alloggiata in una cavità del supporto 17 e dotata di una pluralità di pozzetti 33. Il corpo 1 è realizzato ad esempio di materiale plastico parzialmente o completamente trasparente, quale polycarbonato trasparente fabbricato mediante tecniche di stampaggio e forgiatura. Il corpo 1 e la cartuccia 2 sono fissati reciprocamente mediante clip laterali 29.

Il corpo 1 comprende mezzi per la movimentazione fluidi, qui costituiti da due unità di aspirazione, includenti un primo alloggiamento pistone 14, all'interno del quale è posto un primo pistone 13, e un secondo alloggiamento pistone 12, all'interno del quale è posto un secondo pistone 19. Il primo ed il secondo pistone 13 e 19 e i rispettivi alloggiamenti 14 e 12 sono strutturati in modo da consentire lo scorrimento a tenuta stagna del primo e del secondo pistone 13 e 19 rispettivamente all'interno degli alloggiamenti 14 e 12.

Il corpo 1 comprende inoltre una prima ed una seconda camera siringa 7, 8, costituenti ciascuna un ingresso flui-

do, aperte verso l'esterno su una superficie superiore 80 del corpo 1, ma sigillate (prima dell'uso) da uno strato di chiusura esterno 9 adesivo e perforabile, realizzato ad esempio di alluminio, plastificato sulla parte a contatto con la superficie superiore 80. La parete inferiore della prima e della seconda camera 7, 8 è definita da un diaframma 30, ad esempio realizzato con due strati di plastica inframezzati da uno strato di alluminio, sigillante e perforabile.

Il corpo 1 comprende inoltre un vano-filtraggio 6 posto al di sotto del diaframma 30 e all'interno del quale è posta una matrice filtrante 5 in presenza di agenti di adsorbimento, ad esempio di gel di silice in presenza di sali caotropici. Nella forma di realizzazione mostrata, la superficie superiore del volume del vano-filtraggio 6 è formata dal diaframma 30. Durante l'uso, il vano-filtraggio 6 viene collegato fluidicamente alle camere siringa 7 e 8 per rottura del diaframma 30, come verrà meglio descritto in seguito. In accordo ad una forma di realizzazione, all'interno del vano-filtraggio 6, ad esempio a forma di parallelepipedo, è disposto inoltre un setto parziale 15 che si estende trasversalmente dalle pareti laterali del vano-filtraggio, sostanzialmente parallelo alla base inferiore del corpo 1, e occupa solo parzialmente una sezione trasversale del vano-filtraggio 6 parallela alla base inferiore del corpo 1, formando quindi una apertura di collegamen-

to 42. Il setto parziale 15 determina la suddivisione del volume del vano-filtraggio 6 in un condotto di convogliamento 40, che si estende al di sopra del setto parziale 15, e in un vano-matrice 41, che si estende al di sotto del setto parziale 15 e alloggia la matrice filtrante 5. Il condotto di convogliamento 40 e il vano-matrice 41 sono collegati fluidicamente fra loro attraverso l'apertura di collegamento 42. Il vano-filtraggio 6 comprende inoltre una apertura di uscita 6a disposta sulla base inferiore del vano-filtraggio 6 e apertesi verso un circuito fluidico comprendente un primo, un secondo ed un terzo condotto di comunicazione 3, 4, 11, come descritto più in dettaglio in seguito.

Nell'esempio di realizzazione mostrato in fig. 2, l'apertura di collegamento 42 e l'apertura di uscita 6a sono collocate adiacenti al perimetro della superficie laterale che delimita il vano filtraggio 6, in prossimità di zone opposte del perimetro stesso, in modo tale che il percorso fluidico che si estende fra l'apertura di collegamento 42 e l'apertura di uscita 6a sia di lunghezza massima e la matrice filtrante 5 venga percorsa per la sua intera area.

Il secondo condotto di comunicazione 4 (costituente, insieme al primo condotto di comunicazione 3 un circuito di scarico e, insieme al terzo condotto di comunicazione 11,

un circuito di carico) si estende verso il basso dalla apertura di uscita 6a fino ad una porta di ingresso 51 di una giunzione idraulica a T 50. Questa è dotata inoltre di una prima e di una seconda porta di uscita 52 e 53. Dalla prima porta di uscita 52 della giunzione idraulica a T 50 si estende sostanzialmente orizzontale il primo condotto di comunicazione 3 che si apre su una camera di scarico 20, attraverso un foro di immissione 20b disposto su una parete laterale della stessa. Come rappresentato nell'esempio della fig. 2, la camera di scarico 20 è ad esempio disposta al di sotto del primo alloggiamento pistone 14 e fluidicamente connessa a questo attraverso un primo foro di aspirazione 20a disposto sulla base superiore della camera di scarico 20.

Il primo condotto di comunicazione 3 posto fra la giunzione a T 50 ed il foro di immissione 20b è dotato inoltre di una prima valvola idraulica 27 atta alla regolazione del passaggio dei fluidi dal primo condotto di comunicazione 3 verso la camera di scarico 20.

Dalla seconda porta di uscita 53 della giunzione idraulica a T 50 si estende sostanzialmente orizzontale il terzo condotto di comunicazione 11 che si apre su una camera di aspirazione 10, attraverso un ulteriore foro di immissione 10d disposto su una parete laterale della stessa ed in prossimità della propria base inferiore. Come rappre-

sentato nell'esempio della fig. 2, la camera di aspirazione 10 è ad esempio disposta al di sotto del secondo alloggiamento pistone 12 e fluidicamente connessa a questo attraverso un secondo foro di aspirazione 10a disposto sulla base superiore della camera di aspirazione 10. La base inferiore della camera di aspirazione 10 è dotata di una uscita preparato costituita qui da una pluralità di ugelli 18, disposti ad esempio secondo una matrice, fluidicamente connessi con la camera di aspirazione 10. Gli ugelli 18 si estendono dalla base inferiore della camera di aspirazione 10 in direzione verticale, verso l'esterno della stessa, paralleli fra loro, e si aprono su una superficie inferiore 81 del corpo 1, in posizione affacciata ad una pluralità di pozzetti 33, nella sottostante piastrina 16. Un ulteriore setto parziale 10c si estende all'interno della camera di aspirazione 10 dalla parete laterale della camera di aspirazione 10 su cui è disposto l'ulteriore foro di immissione 10d e al di sopra dello stesso. L'ulteriore setto parziale 10c si estende sostanzialmente orizzontale rispetto alla base inferiore della camera di aspirazione e termina in prossimità della parete opposta della camera di aspirazione 10 da cui si origina la sua estensione, senza congiungersi a questa e determinando così una apertura di aspirazione 10b. In questo modo l'ulteriore setto parziale 10c determina inoltre la suddivisione della camera di aspirazione 10

in due ulteriori volumi: una camera-aria 10e che si sviluppa al di sopra del setto parziale 10c e una camera di convogliamento preparato 10f che si sviluppa al di sotto del setto parziale 10c. La camera-aria 10e e la camera di convogliamento preparato 10f sono connesse fluidicamente fra loro attraverso l'apertura 10b.

Il terzo condotto di comunicazione 11 è inoltre dotato di una seconda valvola idraulica 28, posta fra la camera di aspirazione 10 e la giunzione a T 50, e atta alla regolazione del passaggio dei fluidi dal terzo condotto di comunicazione 11 verso la pluralità di ugelli 18.

Il dispositivo 1000 comprende inoltre una prima ghiera 26 per movimenti micrometrici applicata al primo pistone 13 e una seconda ghiera 25 per movimenti micrometrici applicata al secondo pistone 19. La prima ghiera 26 e la seconda ghiera 25 sono strutturate in modo da attuare una regolazione fine dello scorrimento del primo pistone 13 all'interno del primo alloggiamento 14 e del secondo pistone 19 all'interno del secondo alloggiamento 12, rispettivamente.

Con riferimento alle figg. 3-9, verrà di seguito descritto un metodo di preparazione di un campione contenente materiale biologico utilizzando il dispositivo 1000 di fig. 2. In particolare il metodo che sarà illustrato riguarda la preparazione di un campione biologico per l'analisi RT-PCR

del DNA.

Con riferimento alla fig. 9, inizialmente un campione biologico grezzo da cui estrarre il DNA, ad esempio un campione di sangue intero, è sottoposto ad una fase di pretrattamento 101, eseguito esternamente al dispositivo 1000. Come noto al tecnico del ramo, la fase di pretrattamento comprende la lisi cellulare, ottenuta, ad esempio, ponendo il campione biologico grezzo all'interno di una soluzione ipotonica. La fase di pretrattamento comprende inoltre la digestione delle proteine contaminanti presenti come sottoprodotto della lisi e ottenuta mediante l'utilizzo di appositi enzimi, quali ad esempio la proteinasi K. Alla fine della fase di pretrattamento 101, il campione pretrattato 21a così ottenuto (fig. 3) viene caricato in una prima siringa 21.

Successivamente, viene eseguita la fase di iniezione campione 102 di fig. 9. In dettaglio, fig. 3, la siringa 21 contenente il campione biologico pretrattato 21a è inserita nella seconda camera siringa 8, perforando dapprima lo strato di chiusura esterno 9 e poi il diaframma 30; quindi il campione pretrattato 21a viene iniettato all'interno del vano-filtraggio 6.

Durante la fase di iniezione campione 102, la prima valvola idraulica 27 è aperta, e la seconda valvola idraulica 28 è chiusa.

Contemporaneamente o successivamente, il primo pistone 13 è movimentato verso l'esterno del corpo 1, ad esempio utilizzando la prima ghiera 26. La movimentazione del primo pistone 13 a tenuta stagna all'interno del rispettivo alloggiamento 14 crea una depressione nella camera di scarico 20 che grazie, all'apertura della prima valvola idraulica 27, si propaga fino al vano filtraggio 6 con cui è fluidicamente connessa, forzando il flusso del campione pretrattato 21a nel condotto di convogliamento 40, verso la matrice filtrante 5.

In seguito, fase di adsorbimento 103 di fig. 9 e fig. 4, il campione pretrattato 21a attraversa l'apertura di collegamento 42 e raggiunge la matrice filtrante 5. In questo modo, il campione pretrattato 21a attraversa tutta la matrice filtrante 5 per la sua lunghezza e questo determina l'adsorbimento del DNA contenuto nel campione pretrattato 21a sulla superficie della matrice filtrante 5. Nella fase di adsorbimento 103, anche altri materiali interferenti, quali lipidi e proteine, presenti nel campione pretrattato 21a, possono essere parzialmente adsorbiti sulla superficie della matrice filtrante 5.

Il campione pretrattato 21a, dopo avere attraversato la matrice filtrante 5 e quindi privato della parte del DNA e della parte dei materiali interferenti adsorbiti dalla matrice filtrante 5, fuoriesce dal vano filtraggio 6 attra-

verso l'apertura di uscita 6a, percorre il secondo condotto di comunicazione 4 e, attraverso la giunzione a T 50, passa nel primo condotto di comunicazione 3, riversandosi infine nella camera di scarico 20. La chiusura della seconda valvola 28 impedisce che il campione pretrattato 21a raggiunga accidentalmente gli ugelli 18. Al termine di questa fase, il campione pretrattato 21a, ad eccezione della parte adsorbita sulla matrice filtrante 5, si ritrova all'interno della camera di scarico 20.

Nella successiva fase di iniezione liquido lavaggio 104 di fig. 9, si veda anche la fig. 5, una seconda siringa 31, contenente un liquido di lavaggio 31a, ad esempio acqua distillata o altre soluzioni non contenenti ioni liberi, è inserita nella prima camera siringa 7 e fora il diaframma 30, quindi il liquido di lavaggio 31a viene iniettato all'interno del vano-filtraggio 6.

Contemporaneamente o successivamente, il primo pistone 13 viene ulteriormente movimentato verso l'esterno del corpo 1, ad esempio utilizzando la prima ghiera 26. La movimentazione del primo pistone 13 crea una ulteriore depressione nella camera di scarico 20 che, grazie all'apertura della prima valvola idraulica 27, si propaga fino al vano filtraggio 6 con cui è fluidicamente connessa, forzando il flusso del liquido di lavaggio 31a nel condotto di convogliamento 40, verso la matrice filtrante 5.

Successivamente, fase di lavaggio 105 di fig. 9 e fig. 6, il liquido di lavaggio 31a fluisce, attraverso l'apertura di collegamento 42, nel vano-matrice 41. Di seguito il liquido di lavaggio 31a attraversa la matrice filtrante 5, rimuovendo al suo passaggio le sostanze interferenti, quali proteine e lipidi, adsorbite sulla superficie della matrice filtrante 5 durante la fase di adsorbimento 103.

Dopo avere attraversato la matrice filtrante 5, il liquido di lavaggio 31a, arricchito delle sostanze interferenti rimosse dalla superficie della matrice filtrante 5, fuoriesce dal vano filtraggio 6 attraverso l'apertura di uscita 6a, percorre il secondo condotto di comunicazione 4 e, attraverso la giunzione a T 50, passa nel primo condotto di comunicazione 3, riversandosi infine nella camera di scarico 20. Si noti che la chiusura di una seconda valvola idraulica 28 impedisce che il liquido di lavaggio 31a raggiunga accidentalmente gli ugelli 18. Al termine di questa fase, tutto il liquido di lavaggio 31a è contenuto all'interno della camera di scarico 20.

In seguito, fase di commutazione valvole 107 di fig. 9, la prima valvola idraulica 27 viene chiusa, e la seconda valvola idraulica 28 viene aperta.

Successivamente, fase di iniezione liquido eluente 108 di fig. 9 e fig. 7, un liquido eluente 61a, ad esempio

una soluzione acquosa a bassa concentrazione salina, viene iniettato nel vano filtraggio 6 mediante una terza siringa 61 introdotta nella prima camera siringa 7 .

Contemporaneamente o successivamente, un secondo pistone 19 è movimentato verso l'esterno del corpo 1, ad esempio utilizzando la seconda ghiera 25. La movimentazione del secondo pistone 19 crea una depressione nella camera di aspirazione 10 che, grazie all'apertura della seconda valvola idraulica 28, si propaga fino al vano filtraggio 6 con cui è fluidicamente connessa, forzando il flusso del liquido eluente 61a verso la matrice filtrante 5.

Quindi, fase di eluizione 109 di fig. 9 e fig. 8, il liquido eluente 61a attraversa la matrice filtrante 5 per tutta la sua lunghezza, eluendo il DNA in precedenza adsorbito durante la fase di adsorbimento 105. Quindi, fase di caricamento pozzetti 110 di fig. 9 e fig. 8, il liquido eluente 61a, ora contenente il DNA eluito e costituente un campione preparato 70, prosegue attraversando il secondo condotto di comunicazione 4, la giunzione a T 50 e il terzo condotto di comunicazione 11, raggiungendo gli ugelli 18 e da questi, per capillarità e gravità, si riversa nei corrispondenti pozzetti 33.

Si noti che la chiusura della prima valvola idraulica 27 impedisce che il campione preparato 70 raggiunga accidentalmente la camera di scarico 20.

In questo modo, il campione preparato 70 è disponibile all'interno della pluralità di pozzetti 33.

Infine, fase di sigillatura 111, vengono rimosse le clip 29, la cartuccia 2 viene staccata dal corpo 1 e sui pozzetti 33 viene versato un liquido sigillante, ad esempio olio minerale, ottenendo la sigillatura del campione preparato all'interno dei pozzetti 33. La cartuccia, con il campione preparato 70 in essa contenuto, è a questo punto inseribile in un termociclatore (non mostrato) per condurre l'analisi RT-PCR, in modo di per sé noto e qui non descritto in dettaglio.

Le figg. 10 e 11 mostrano una variante del dispositivo 1000 di fig. 2. Qui, un dispositivo 2000 comprende un corpo 200 realizzato ad esempio di materiale plastico, parzialmente o completamente trasparente, quale polycarbonato trasparente fabbricato mediante tecniche di stampaggio e forgiatura. Il corpo 200 ha ad esempio forma di parallelepipedo ed uno sviluppo sostanzialmente planare, in cui la dimensione verticale è considerevolmente inferiore alle due dimensioni orizzontali, ad esempio $4 \times 8 \times 1 \text{ cm}^3$. Mediante tecniche di stampaggio e forgiatura, all'interno del corpo 200 si crea un circuito idraulico per la movimentazione di fluidi la cui struttura sarà descritta in dettaglio di seguito.

Il corpo 200 comprende un primo pozzetto d'ingresso

201 e un secondo pozzetto d'ingresso 202 costituenti ciascuno un ingresso fluido. Il primo e il secondo pozzetto d'ingresso 201 e 202 sono aperti verso l'esterno sulla superficie superiore 270 del corpo 200 e ricoperti prima dell'uso da uno strato di chiusura esterno non mostrato.

Sulla superficie laterale del primo pozzetto d'ingresso 201 è disposto un primo foro di adduzione 201a da cui si estende orizzontalmente un primo condotto di adduzione 203 che si collega ad una prima porta di ingresso 205a di una prima giunzione idraulica a T 205. Sulla superficie laterale del secondo pozzetto d'ingresso 202 è disposto un secondo foro di adduzione 202a da cui si estende orizzontalmente un secondo condotto di adduzione 204 che si collega ad una seconda porta di ingresso 205b della prima giunzione idraulica a T 205. Da una porta di uscita 205c della prima giunzione idraulica a T 205 si estende orizzontalmente un terzo condotto di adduzione 206 che si collega a un terzo foro di adduzione 207a disposto sulla superficie laterale di un vano-filtraggio 207 al cui interno è ancorata la matrice filtrante 5. Il vano filtraggio 207 è inoltre dotato di un foro di uscita 207b, ad esempio disposto in posizione opposta al foro di ingresso 207a, e da cui si estende orizzontalmente un primo condotto di comunicazione 209 che si collega ad un ingresso di una seconda giunzione idraulica a T 210. Un condotto di scarico 211 estende oriz-

zontalmente dalla seconda giunzione idraulica a T 210 e si apre su una camera di scarico 212, attraverso un foro di immissione 212a disposto sulla superficie laterale della stessa. La camera di scarico 212 è inoltre dotata sulla propria superficie laterale di un primo foro di aspirazione 212b da cui si estende orizzontalmente un primo condotto di aspirazione 213 che termina su un primo foro di ingresso 213a disponibile sulla superficie laterale del corpo 200. Esternamente al corpo 200, una prima unità di pompaggio 214 è collegata tramite raccordi 221 al primo foro di ingresso 213a.

Sul condotto di scarico 211 è inoltre disposta la seconda valvola idraulica 27 per la regolazione del passaggio dei fluidi dal condotto di scarico 211 verso la camera di scarico 212.

Un condotto-preparato 215 si estende orizzontalmente dalla seconda giunzione idraulica a T 210 ed è dotato di una uscita preparato costituita qui da una pluralità di condotti d'iniezione 218, fluidicamente collegati al condotto-preparato 215. I condotti d'iniezione 218 si estendono orizzontali, paralleli fra loro, e terminano all'interno di una camera alloggiamento chip 217 atta ad ospitare la piastrina 16. La piastrina 16 è fissata al fondo della camera alloggiamento chip 217, ad es. tramite incollaggio. I condotti di iniezione 218 sono configurati in modo da ter-

minare o avere delle aperture (non mostrate) in posizione affacciata ai pozzetti 33.

La camera alloggiamento chip 217 è dotata, sulla propria superficie laterale, di un secondo foro di aspirazione 217a da cui si estende un secondo condotto di aspirazione 219 che termina su un secondo foro di ingresso 219a disponibile sulla superficie laterale del corpo 200 e che mette in comunicazione il secondo condotto di aspirazione 219 con l'esterno del corpo 200. Una seconda unità di pompaggio 220 è collegata tramite raccordi 221 al secondo foro di ingresso 219a. In questa forma di realizzazione, la prima e la seconda unità di pompaggio 214, 220, costituiscono mezzi per la movimentazione fluidi.

La prima valvola idraulica 28 è disposta qui sul condotto-preparato 215, fra i condotti di iniezione 218 e la seconda giunzione a T 210.

Il metodo di preparazione di un campione contenente materiale biologico utilizzando il dispositivo 2000 delle figg. 10 e 11 è analogo a quanto descritto per il dispositivo 1000 di fig. 2. Si sottolinea solamente che, nel presente caso, la movimentazione dei liquidi fino ai condotti di iniezione 218 avviene solo per effetto della depressione generata dalle unità di pompaggio 214 e 220, senza l'aiuto della gravità. Inoltre, la seconda unità di pompaggio 220 genera una depressione direttamente all'interno della came-

ra alloggiamento chip 217.

Dopo il caricamento del campione preparato, è possibile anche in questo caso sigillare i pozzetti 33 tramite olio. In questo caso, un ulteriore pozzetto di ingresso (non mostrato) può essere disposto in prossimità della camera di caricamento preparato 217 e collegata al condotto preparato 215 o direttamente ai condotti di iniezione 218.

Infine, al termine di caricamento ed eventuale sigillatura dei pozzetti 33 e dopo avere scollegato le unità di pompaggio esterne 214, 220, il corpo 200 viene inserito in un termociclatore (non mostrato) per la successiva analisi RT-PCR basata sulla rilevazione della fluorescenza grazie alle caratteristiche di trasparenza del materiale del corpo 200.

La fig. 12 mostra un dettaglio di una diversa forma di realizzazione. Qui un dispositivo 3000 ha una struttura generale simile a quella del dispositivo 1000 di fig. 2, ad eccezione delle valvole idrauliche 27 e 28, sostituite da rispettive valvole idrauliche automatiche qui formate da sfere 303c, 311a, mobili all'interno del primo e del terzo condotto di comunicazione, qui indicati rispettivamente con 300, 311. Per il resto, il dispositivo 3000 è uguale al dispositivo 1000 di fig. 2, per cui le parti comuni non sono rappresentate.

In questa forma di realizzazione, il primo condotto

di comunicazione 303 si estende parzialmente all'interno della camera di scarico 20 ed è dotato qui di un foro di scarico 303a rivolto verso la base inferiore della camera di scarico 20. La porzione del primo condotto di comunicazione 303 all'interno della camera di scarico 20 è dotata, in corrispondenza della propria sezione terminale, di un primo diaframma parziale 303b. Il primo diaframma parziale 303b è disposto trasversale alla direzione longitudinale del primo condotto di comunicazione 303, ostruisce solo parzialmente la sezione terminale, determinando la formazione di un foro aspirazione sfera 303e e formando un riscontro per la sfera mobile 303c. Il foro di aspirazione sfera 303e e il foro di scarico 303a hanno sezione inferiore all'ingombro della sfera 303c in modo che essa non possa fuoriuscire dal primo condotto di comunicazione 3 attraverso di essi. Il primo condotto di comunicazione 303 è inoltre dotato di un secondo diaframma parziale 303d disposto a monte del foro di scarico 303a, su una sezione trasversale alla direzione longitudinale del primo condotto di comunicazione 303. Il secondo diaframma parziale 303d ostruisce solo parzialmente la sezione trasversale stessa, formando un'apertura di collegamento 303f e costituendo un riscontro per la sfera mobile 303c.

La sezione trasversale del primo condotto di comunicazione 303 e il diametro della sfera mobile 303c sono

scelti in modo da consentire lo scorrimento della sfera mobile 303c all'interno del primo condotto di comunicazione 303, almeno nel tratto compreso fra il primo ed il secondo diaframma 303b, 303d.

Nella forma di realizzazione in fig. 12, il terzo condotto di comunicazione 311 è dotato di un foro di collegamento 311d e un ulteriore foro di aspirazione sfera 311e si estende parzialmente all'interno della camera di aspirazione 10. Un setto parziale 310c si estende all'interno della camera di aspirazione 30, al di sotto del terzo condotto di comunicazione 311, analogamente all'ulteriore setto parziale 10c di fig. 2. In dettaglio, in fig. 12, la porzione del terzo condotto di comunicazione 311 interna alla camera di aspirazione 10 si estende parallela e al di sopra del setto parziale 310c ed è in contatto con la superficie superiore del setto parziale stesso per tutta la propria estensione.

Il terzo condotto di comunicazione 311 è dotato in corrispondenza della propria sezione terminale di un terzo diaframma parziale 311c. Il terzo diaframma parziale 311c è disposto trasversale alla direzione longitudinale del terzo condotto di comunicazione 311, ostruisce solo parzialmente la propria sezione terminale, formando l'ulteriore foro di aspirazione sfera 311e, e forma un riscontro per l'ulteriore sfera 311a. L'ulteriore foro di aspirazione

sfera 311e ha una superficie inferiore all'ingombro dell'ulteriore sfera mobile 311a.

Il foro di collegamento 311d (costituito sia nel terzo condotto di comunicazione 311 che nel sottostante setto parziale 310c) è disposto in posizione affacciata verso la base inferiore della camera di aspirazione 10 e di sezione inferiore alla superficie all'ingombro dell'ulteriore sfera mobile 311a. Il foro di collegamento 311d connette fluidicamente la camera di convogliamento preparato 10f e il terzo condotto di comunicazione 311.

Il terzo condotto di comunicazione 311 è dotato di un quarto diaframma parziale 311b disposto su una sezione trasversale alla direzione longitudinale del terzo condotto di comunicazione 311 e ostruente solo parzialmente la sezione trasversale stessa, formando una ulteriore apertura di collegamento 311f e costituendo un riscontro per l'ulteriore sfera mobile 311a. La sezione trasversale del terzo condotto di comunicazione 311 e il diametro della sfera 311a sono scelti in modo da consentire lo scorrimento dell'ulteriore sfera mobile 311a all'interno del terzo condotto di comunicazione 311.

Il funzionamento del dispositivo 3000 di fig. 12 verrà descritto limitatamente all'azionamento delle valvole idrauliche. In particolare, durante le fasi di iniezione campione 102, adsorbimento 103, iniezione liquido lavaggio

104 e lavaggio 105 di fig. 9, in cui il primo pistone 13 (fig. 2) viene estratto (come rappresentato in fig. 12 dalla freccia A) e si produce una depressione all'interno della camera di aspirazione 20, la sfera mobile 303c viene spinta verso il foro di aspirazione sfera 303e (posizione tratteggiata). Di conseguenza, la camera di scarico 20 è collegata fluidicamente al primo condotto di comunicazione 303 attraverso il foro di scarico 303a. Questa condizione equivale all'apertura della prima valvola idraulica 27 in fig. 2.

Allo stesso tempo la depressione nella camera di scarico 20 si propaga al terzo condotto di comunicazione 311, provocando il movimento dell'ulteriore sfera 311a verso il terzo diaframma parziale 311b (posizione tratteggiata). Qui, l'ulteriore sfera 311a occlude totalmente l'ulteriore apertura di collegamento 311f, analogamente alla chiusura della seconda valvola idraulica 28 di fig. 2.

In modo duale, nelle fasi di iniezione liquido eluente 108, eluizione 109 e caricamento pozzetti 110 di fig. 9, in cui il secondo pistone 19 (fig. 2) viene estratto (come rappresentato in fig. 12 dalla freccia B), la depressione all'interno della camera di aspirazione 10 provoca lo spostamento dell'ulteriore sfera mobile 311a fino ad arrivare a contatto con il terzo diaframma parziale 311c (in cui l'ulteriore sfera mobile 311a è rappresentata con linea

continua), occludendo l'ulteriore foro di aspirazione 311e. Di conseguenza si ottiene il collegamento fluidico fra il terzo condotto di comunicazione 311 e la camera di aspirazione 10, corrispondente alla apertura della seconda valvola idraulica 28 di fig. 2.

Allo stesso tempo la depressione nella camera di aspirazione 10 provoca lo spostamento della sfera 303c verso il secondo diaframma parziale 303d (posizione della sfera mobile 303c in linea continua), occludendo l'ulteriore apertura di collegamento 303f, analogamente alla chiusura della prima valvola idraulica 27 in fig. 2.

Come evidente al tecnico del ramo, le valvole idrauliche 27 e 28 di fig. 10 possono essere realizzate in modo analogo.

La fig. 13 illustra un apparecchio 4000 per l'esecuzione di analisi cliniche includente il dispositivo 1000 descritto in precedenza. L'apparecchio 4000 comprende attuatori elettrici 404 e 405, un dispositivo elettronico 401 mezzi contenitori per fluidi 421 e un modulo di iniezione 414. Il dispositivo elettronico 401 è dotato ad esempio di un'unità di processamento 431, di un'unità di ingresso/uscita 432 e di un'unità di memoria 441. I mezzi contenitori per fluidi sono ad esempio formati da tre serbatoi 421, destinati a contenere il campione biologico pretrattato 21a, il liquido di lavaggio 31a ed il liquido eluente

61a. Il modulo di iniezione 414 è configurato in modo da porre in comunicazione fluidica selettiva ciascuno dei tre serbatoi 421 e l'ingresso fluido del dispositivo 1000. la connessione è comandabile elettricamente, ad esempio mediante controllo di elettrovalvole comprese nel modulo di iniezione 414 ma non mostrate.

L'apparecchio 4000 è inoltre dotato di mezzi per la rilevazione ottica di presenza o assenza del fluido all'interno del circuito fluidico, qui formati da una prima sorgente laser 408 e un corrispondente primo fotodiodo rivelatore 412, e da una seconda sorgente laser 409 e un corrispondente secondo fotodiodo rivelatore 413. La prima sorgente laser 408 e il primo fotodiodo rivelatore 412 sono posizionati in modo da intercettare trasversalmente il primo condotto di comunicazione 3 (fig. 2). La seconda sorgente laser 409 e il secondo fotodiodo rivelatore 413 sono posizionati in modo da intercettare trasversalmente il terzo condotto di comunicazione 11 (fig. 2). La prima sorgente laser 408 e il primo fotodiodo rivelatore 412 sono configurati per rilevare e comunicare elettricamente il completato attraversamento del campione biologico pretrattato 21a, e del liquido di lavaggio 31a nel primo condotto di comunicazione 3 (fig. 2) grazie alla trasparenza del corpo 1. Analogamente, la seconda sorgente laser 409 e il corrispondente secondo fotodiodo rivelatore 413 sono configurati per

rilevare e comunicare elettricamente il completato attraversamento del campione preparato 70 (fig. 8) nel terzo condotto di comunicazione 11.

Il dispositivo elettronico 401 è collegato e controlla gli attuatori elettrici 404 e 405, le sorgenti laser 408 e 409, i fotodiodi rivelatori 412 e 413 e al modulo di iniezione 414.

All'interno della memoria 441 può essere caricato un software eseguibile dall'unità di processamento 431, in modo da attuare gli attuatori elettrici 404, 405, la prima e la seconda sorgente laser, 408, 409, il primo e il secondo fotodiodo rivelatore 412 e 413 ed il modulo di iniezione 414, al fine di eseguire le fasi del metodo di fig. 9 in modo automatico.

In particolare la scansione temporale delle fasi del metodo di fig. 9 è controllata dal dispositivo elettronico 401 sulla base dei segnali forniti dai fotodiodi rivelatori 412, 413.

Come evidente al tecnico del ramo, l'apparecchio 4000 può comprendere, invece del dispositivo 1000, il dispositivo 2000 o con il 3000 delle figg. 10, 12.

Le soluzioni descritte presentano numerosi vantaggi. Infatti, esse sono integrabili con sistemi esperti utilizzabili non solo in ambito specialistico ma anche a livello ambulatoriale/domestico (nel caso di autodiagnosi).

Grazie al fatto che le operazioni di adsorbimento, lavaggio e eluizione vengono eseguite all'interno di un singolo corpo, chiuso rispetto all'ambiente esterno e quindi non soggetto a contaminazione, tali dispositivi sono in grado, inoltre, di garantire un elevato grado di purezza del campione preparato, aumentando l'affidabilità diagnostica. Inoltre, l'esecuzione di tali operazioni in sequenza all'interno dello stesso dispositivo, consente di ridurre i tempi di analisi.

Il dispositivo può operare inoltre su volumi di campione e quindi di reagenti ridotti, riducendo quindi i costi di analisi e aumentando la resa. Infatti, il trattamento dei liquidi all'interno dello stesso vano filtraggio consente di ridurre le perdite tipiche dei kit noti, non richiedendo più il trasferimento dei prodotti intermedi in diverse provette/pipette.

Le soluzioni proposte soddisfano il requisito di purezza, intesa sia come presenza in soluzione dell'acido nucleico in esame, sia come assenza di sostanze contaminanti che, legandosi ai reagenti in soluzione, potrebbero modificare i risultati dell'esperimento successivo (PCR, RT-PCR, Sequenziamento, Restrizione,...).

Inoltre, il dispositivo descritto elimina i rischi di contaminazione dell'ambiente esterno, grazie al fatto di eseguire le fasi di adsorbimento, lavaggio e eluizione

all'interno del dispositivo stesso.

I dispositivi descritti possono essere predisposti in modo da essere azionati in modo semiautomatico o automatico mediante opportuni macchinari, come sopra spiegato.

Nella soluzione di fig. 2, il caricamento dei pozzetti 33 avviene senza di soluzione di continuità al termine della fase di eluizione, per effetto del trasferimento del campione preparato 70 attraverso il secondo condotto di comunicazione 4, il terzo condotto di comunicazione 11 e i condotti di iniezione 18.

Nella soluzione di fig. 10, il dispositivo 2000 può essere caricato vantaggiosamente e direttamente nel termociclatore, senza richiedere apposite operazioni di apertura del dispositivo, estrazione e trasferimento della cartuccia 2, eliminando quindi eventuali rischi rimanenti di contaminazione, errori di trasferimento e/o caricamento della piastrina di silicio 16.

Il dispositivo e il metodo qui descritti sono suscettibili di numerose modifiche e varianti, tutte comprese nell'ambito protettivo dell'invenzione, come definito dalle rivendicazioni allegate.

Ad esempio, nella soluzione di fig. 2, i mezzi di fissaggio del corpo 1 alla cartuccia 2 possono essere differenti da quanto mostrato, ad esempio possono essere costituiti da sistemi di ritegno meccanico, quali staffe av-

vitare, elementi di aggancio reciproco o altri elementi elastici.

I mezzi per la movimentazione fluidi possono essere realizzati diversamente, come elementi interni o esterni al corpo 1; ad esempio nella soluzione di fig. 2 possono essere previste unità di pompaggio simili a quelle mostrate in fig. 10; ma altri tipi di elementi di pompaggio possono essere utilizzati, ad esempio pompe comandate elettricamente, collegabili al dispositivo 1000, 2000, 3000 prima dell'uso, o inserite in una apposita macchina automatica di controllo delle operazioni di analisi (non mostrata).

In fig. 2, le due unità di aspirazione 13-14, e 12-19 possono essere disposte orizzontalmente, con il primo ed il secondo alloggiamento pistone 13 e 14 disposti lateralmente alla camera di scarico 20 e alla camera di aspirazione 10, rispettivamente.

Secondo una variante, la prima e la seconda valvola idraulica 27, 28 del dispositivo 1000 di fig. 2 sono del tipo a controllo elettrico, con un modulo di comando 82 (mostrato tratteggiato) configurato per generare rispettivi segnali di apertura e chiusura. Ovviamente, anche il dispositivo 2000 può essere dotato di valvole idrauliche 27, 28 a comando elettrico.

In fig. 2, il primo ed il terzo condotto di comunicazione 3, 11 possono essere realizzati in modo da sfruttare

la gravità, con una pendenza negativa dalla giunzione idraulica a T 50 verso rispettivamente la camera di scarico 20 e la camera di aspirazione 10.

In fig. 2, il corpo 1 può comprendere una sola camera siringa invece delle camere 7, 8. In questo caso, il campione pretrattato 21a, il liquido di lavaggio 31a e liquido eluente 61a vengono tutti iniettati attraverso una stessa camera siringa. In alternativa, possono essere previste tre camere siringa rispettivamente per il campione pretrattato 21a, il liquido di lavaggio 31a, e il liquido eluente 61a. Analoga variante vale per i dispositivi 2000, 3000.

Nella forma di realizzazione di fig. 12, inoltre, la limitazione della corsa delle sfere 303c, 311a potrebbe essere ottenuta, invece che mediante i riscontri 303b, 303d, 311b, 311c, realizzando i condotti di comunicazione 303, 311 di sezione non uniforme, maggiore nella zona di movimento delle sfere, e minore altrove, o prevedendo strozzature nei condotti di comunicazione stessi.

RIVENDICAZIONI

1. Dispositivo (1000;2000;3000) per la preparazione di campioni biologici, comprendente:

un ingresso fluido (7,8;201,202);

un vano di filtraggio (6; 207), collegato all'ingresso fluido ed alloggiante una matrice filtrante (5) in presenza di agenti di adsorbimento;

un circuito fluidico (3,4,11,50;211,209,210,215) collegato a valle del vano di filtraggio e includente un circuito di scarico (4,50,3;209,210,211) ed un circuito di carico (4,50,11;209,210,215);

una camera di scarico (20;212), collegata a valle del circuito di scarico (4,50,3;209,210,211);

un'uscita preparato (18;218), collegata a valle del circuito di carico (4,50,11;209,210,215); e

mezzi di movimentazione fluidi (13,14,12,19; 214,220), collegati al circuito fluidico e configurati in modo da collegare fluidicamente il vano di filtraggio (6) alternativamente al circuito di scarico (4,50,3) o al circuito di carico (4,50,11).

2. Dispositivo (1000; 2000; 3000) secondo la rivendicazione 1, in cui i mezzi di movimentazione fluidi (13,14,12,19;214,220) comprendono unità di pompaggio (13,14;214; 214, 220).

3. Dispositivo (1000; 2000; 3000) secondo la rivendicazione 2, in cui le unità di pompaggio comprendono una prima unità di pompaggio (13,14;214) collegata al circuito di scarico (4,50,3; 209,210,211) e una seconda unità di pompaggio (12,19;220), collegata al circuito di carico (4,50,11; 209,210,215).

4. Dispositivo (1000; 3000) secondo la rivendicazione 3, in cui la prima e la seconda unità di pompaggio (13, 14,12, 19; 214, 220) sono unità di aspirazione, in particolare formate da un rispettivo pistone (13, 19) mobile in una rispettiva camera di alloggiamento pistone (14,12) e da una rispettiva ghiera (25,26) atta alla movimentazione fine del rispettivo pistone (13, 19) della rispettiva unità di aspirazione.

5. Dispositivo (1000; 2000; 3000) secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-4, comprendente inoltre primi mezzi valvolari disposti lungo il circuito di carico (4,50,11;209,210,215) e secondi mezzi valvolari disposti lungo il circuito di scarico (4,50,3; 209,210,211).

6. Dispositivo (1000; 2000; 3000) secondo la rivendicazione 5, in cui i primi e i secondo mezzi valvolari (27,28;) comprendono valvole controllate elettricamente collegate a un modulo di comando esterno.

7. Dispositivo (1000; 2000; 3000) secondo la rivendicazione 5, in cui il primi mezzi valvolari comprendono una prima

sfera (303c) scorrevole all'interno del circuito di scarico (4,50,3;209,210,211) fra un primo ed un secondo elemento di riscontro (303d,303b); e i secondi mezzi valvolari comprendono una seconda sfera (311a) scorrevole all'interno del circuito di carico (4,50,11;209,210,215) detta porzione del circuito di carico (4,50,11;209,210,215) fra un terzo ed un quarto elemento di riscontro (311c,311b).

8. Dispositivo (1000;2000;3000) secondo una qualunque delle rivendicazioni 1-7, comprendente inoltre un corpo (1;200), in particolare almeno parzialmente trasparente, l'ingresso fluido (7,8; 201,202), il vano filtraggio (6;207), il circuito fluidico (3,4,11,50; 211,209,210,215), la camera di scarico (20;212) e l'uscita preparato (18;218) essendo formati all'interno di detto corpo (1;200).

9. Dispositivo (1000; 2000; 3000) secondo la rivendicazione 8, comprendente inoltre una piastrina (16) di materiale semiconduttore avente almeno un pozzetto (33) affacciato all'uscita preparato (18;218).

10. Dispositivo (1000; 3000) secondo la rivendicazione 9, comprendente una cartuccia (2) includente un supporto (17) alloggiante la piastrina (16).

11. Dispositivo (1000; 3000) secondo la rivendicazione 10, in cui il corpo (1) é disposto al di sopra della cartuccia (2), il corpo (1) e la cartuccia (2) essendo fissati reciprocamente

mediante mezzi di fissaggio (29).

12. Dispositivo (1000; 3000) secondo la rivendicazione 11, in cui il corpo (1) comprende una superficie superiore (80) ed una superficie inferiore (81), l'ingresso fluido (7,8) aprendosi sulla superficie superiore e l'uscita preparato (18) aprendosi sulla superficie inferiore, il vano filtraggio (6) è disposto inferiormente all'ingresso fluido (7,8) e il circuito fluidico (4,50,3,11) è disposto inferiormente al vano filtraggio (6).

13. Dispositivo (1000; 3000) secondo la rivendicazione 12, in cui l'ingresso fluido (7,8) comprende almeno una camera siringa (7,8) configurata per alloggiare una siringa di iniezione e disposta superiormente al vano filtraggio (6), detta camera siringa (7,8) e detto vano filtraggio (6) essendo separati da un diaframma (30) perforabile.

14. Dispositivo (1000; 3000) secondo una qualunque delle rivendicazioni 10-13, in cui il vano filtraggio (6) comprende un setto parziale (15), un perimetro e un'apertura di uscita (6a); il setto parziale estendendosi da una parete laterale del vano filtraggio (6) e suddividendo il vano filtraggio (6) in un condotto di convogliamento (40) che si estende al di sopra del setto parziale (15) e in un vano-matrice (41) che si estende al di sotto del setto parziale (15), il setto parziale definendo una apertura di collegamento fluidico (42) fra il condotto di

convogliamento (40) e il vano-matrice (41), , l'apertura di collegamento fluidico (42) e l'apertura di uscita (6a) essendo disposte in zone opposte del perimetro del vano filtraggio (6).

15. Dispositivo (2000) secondo la rivendicazione 8, in cui il corpo (200) ha uno sviluppo principalmente orizzontale, e detto ingresso fluido (201,202), detto vano di filtraggio (207), detto circuito fluidico (211,209,210,215), detta uscita preparato (218) e detta camera di scarico (212) sono disposti lateralmente affiancati.

16. Dispositivo (2000) secondo la rivendicazione 15, in cui il corpo (200) alloggia una piastrina (16) di materiale semiconduttore comprendente almeno un pozzetto (33) affacciato all'uscita preparato (218).

17. Apparecchio (4000) per l'esecuzione di analisi biologiche, comprendente:

un dispositivo secondo una delle rivendicazioni 1-15;

un'unità di comando elettronica (401);

almeno un serbatoio (421) collegato all'ingresso fluido (7,8;201,202) mediante un modulo di iniezione (414) comandabile elettricamente, attuatori (404, 405) di movimentazione fluidi comandabili elettricamente, mezzi di rilevazione fluido (408, 409, 412, 413) comandabili elettricamente, per verificare la presenza di fluido all'interno del circuito di scarico (4,50,3;209,210,211) e del circuito di carico (4,50,11;

209,210,215); l'unità di comando elettronica (401) essendo collegata e scambiando istruzioni e informazioni con il modulo di iniezione (414), gli attuatori (404, 405), e ai mezzi di rilevazione fluido (408, 409, 412, 413).

18. Metodo di preparazione di un campione biologico comprendente:

fornire un campione biologico pretrattato (21a) avente sequenze di materiale biologico ad un dispositivo (1000; 2000; 3000) attraverso un ingresso fluido (7,8;201,202);

far fluire il campione biologico pretrattato (21a) all'interno di una camera filtraggio (6;207) alloggiante una matrice filtrante (5) in presenza di agenti di adsorbimento, causando l'adsorbimento (103) di almeno una porzione delle sequenze sulla superficie di detta matrice filtrante (5);

scaricare il campione biologico pretrattato (21a) privato della porzione delle sequenze in una camera di scarico (20;212) del dispositivo (1000;2000;3000);

fornire un liquido di lavaggio (31a) nel dispositivo (1000;2000;3000) attraverso l'ingresso fluido (7,8;201,202);

far fluire il liquido di lavaggio (31a) all'interno della camera di filtraggio (6;207), realizzando il lavaggio (105) di detta matrice filtrante (5);

scaricare il liquido di lavaggio nella camera di scarico (20;212);

fornire un liquido eluente (61a) nel dispositivo (1000; 2000; 3000) attraverso l'ingresso fluido (7,8;201,202);

far fluire il liquido eluente (61a) all'interno della camera di filtraggio (6;207) ed eluire (109) la porzione delle sequenze nel liquido eluente (61a), ottenendo un campione preparato (70);

far fluire il campione preparato (70) verso un'uscita preparato (218;18); e

caricare almeno un pozzetto (33).

19. Metodo di preparazione di un campione biologico secondo la rivendicazione 17, in cui:

far fluire il campione biologico pretrattato (21a) all'interno di una camera filtraggio (6;207), scaricare il campione biologico pretrattato (21a) in una camera di scarico (20;212), far fluire il liquido di lavaggio (31a) all'interno della camera di filtraggio (6;207), scaricare il liquido di lavaggio nella camera di scarico (20;212) comprendono collegare fluidicamente la camera filtraggio (6) con la camera di scarico (20;212) e generare una depressione all'interno della camera di scarico (20;212) e della camera filtraggio (6),

e far fluire il liquido eluente (61a) all'interno della camera di filtraggio (6;207) e far fluire il campione preparato (70) verso un'uscita preparato (18;218) comprendono collegare fluidicamente la camera filtraggio (6) con il circuito di cari-

co (4,50,11;209,210,215) e generare una depressione all'interno di un circuito di carico (4,50,11;209,210,215) e alla camera filtraggio (6).

p.i.: STMICROELECTRONICS S.R.L.

Elena CERBARO

CLAIMS

1. A device (1000; 2000; 3000) for preparing biologic samples, comprising:

- 5 a fluid inlet (7, 8; 201, 202);
a filtering compartment (6; 207), connected to the fluid inlet and accommodating a filtering matrix (5) in presence of adsorption agents;
a fluidic circuit (3, 4, 11, 50; 211, 209, 210, 215) connected
10 downstream of the filtering compartment and including a discharge circuit (4, 50, 3; 209, 210, 211) and a loading circuit (4, 50, 11; 209, 210, 215);
a discharge chamber (20; 212), connected downstream of the discharge circuit (4, 50, 3; 209, 210, 211);
15 a preparation outlet (18; 218), connected downstream of the loading circuit (4, 50, 11; 209, 210, 215); and
fluid moving means (13, 14, 12, 19; 214, 220), connected to the fluidic circuit and configured to fluidically connect the filtering compartment (6) alternatively to the discharge
20 circuit (4, 50, 3) or to the loading circuit (4, 50, 11).

2. The device (1000; 2000; 3000) according to claim 1, wherein the fluid moving means (13, 14, 12, 19; 214, 220) comprises pumping units (13, 14; 214; 214, 220).

- 25 3. The device (1000; 2000; 3000) according to claim 2, wherein the pumping units comprise a first pumping unit (13, 14; 214) connected to the discharge circuit (4, 50, 3; 209, 210, 211) and a second pumping unit (12, 19; 220), connected to the
30 loading circuit (4, 50, 11; 209, 210, 215).

4. The device (1000; 3000) according to claim 3, wherein the first and second pumping units (13, 14, 12, 19; 214, 220) are suction units, in particular formed by a respective piston
35 (13, 19) mobile in a respective piston housing chamber (14,

12) and by a respective ringnut (25, 26) designed for fine movement of the respective piston (13, 19) of the respective suction unit.

5 5. The device (1000; 2000; 3000) according to any of claims 1-4, further comprising first valve means arranged along the loading circuit (4, 50, 11; 209, 210, 215) and second valve means arranged along the discharge circuit (4, 50, 3; 209, 210, 211).

10

6. The device (1000; 2000; 3000) according to claim 5, wherein the first and second valve means (27, 28) comprise electrically controlled valves connected to an external control module.

15

7. The device (1000; 2000; 3000) according to claim 5, wherein the first valve means comprise a first ball (303c) movable within the discharge circuit (4, 50, 3; 209, 210, 211) between a first and a second contrast element (303d, 303b); and the
20 second valve means comprise a second ball (311a) movable within the loading circuit (4, 50, 11; 209, 210, 215) between a third and a fourth contrast element (311c, 311b).

8. The device (1000; 2000; 3000) according to any of claims 1-
25 7, further comprising a body (1; 200), in particular at least partially transparent, the fluid inlet (7, 8; 201, 202), the filtering compartment (6; 207), the fluidic circuit (3, 4, 11, 50; 211, 209, 210, 215), the discharge chamber (20; 212) and the preparation outlet (18; 218) being formed within said body
30 (1; 200).

9. The device (1000; 2000; 3000) according to claim 8, further comprising a chip (16) of semiconductor material having at least one well (33) facing the preparation outlet (18; 218).

35

10. The device (1000; 3000) according to claim 9, comprising a cartridge (2) including a support (17) housing the chip (16).

11. The device (1000; 3000) according to claim 10, wherein the
5 body (1) is arranged above the cartridge (2), the body (1) and the cartridge (2) being fixed together by fixing means (29).

12. The device (1000; 3000) according to claim 11, wherein the
10 body (1) comprises a top surface (80) and a bottom surface (81), the fluid inlet (7, 8) opening on the top surface and the preparation outlet (18) opening on the bottom surface, the filtering compartment (6) is arranged underneath the fluid inlet (7, 8) and the fluidic circuit (4, 50, 3, 11) is arranged underneath the filtering compartment (6).

15
13. The device (1000; 3000) according to claim 12, wherein the fluid inlet (7, 8) comprises at least one syringe chamber (7, 8) configured to accommodate an injection syringe and arranged above the filtering compartment (6), said syringe chamber (7, 8) and said filtering compartment (6) being separated by a
20 perforable diaphragm (30).

14. The device (1000; 3000) according to any of claims 10-13, wherein the filtering compartment (6) comprises a partial
25 diaphragm (15), a perimeter, and an outlet opening (6a); the partial diaphragm extending from a side wall of the filtering compartment (6) and dividing the filtering compartment (6) into a conveying duct (40) that extends above the partial diaphragm (15) and a matrix compartment (41) that extends
30 underneath the partial diaphragm (15), the partial diaphragm defining a fluidic connection opening (42) for fluidic connecting the conveying duct (40) and the matrix compartment (41), the fluidic connection opening (42) and the outlet opening (6a) being arranged in opposite areas of the perimeter
35 of the filtering compartment (6).

15. The device (2000) according to claim 8, wherein the body (200) has a mainly horizontal development, and said fluid inlet (201, 202), said filtering compartment (207), said fluidic circuit (211, 209, 210, 215), said preparation outlet (218), and said discharge chamber (212) are arranged laterally side-by-side.

16. The device (2000) according to claim 15, wherein the body (200) accommodates a chip (16) of semiconductor material comprising at least one well (33) facing the preparation outlet (218).

17. An apparatus (4000) for conducting biological analyses, comprising:

a device according to any of claims 1-15;

an electronic control unit (401);

at least one reservoir (421) connected to the fluid inlet (7, 8; 201, 202) by an electrically controllable injection module (414), electrically controllable actuators (404, 405) for advancing fluids, and electrically controllable fluid detecting means (408, 409, 412, 413) for verifying the presence of fluid within the discharge circuit (4, 50, 3; 209, 210, 211) and the loading circuit (4, 50, 11; 209, 210, 215),

the electronic control unit (401) being connected to, and exchanging instructions and information with, the injection module (414), the actuators (404, 405), and the fluid detecting means (408, 409, 412, 413).

18. A method for preparing a biologic sample comprising:

supplying a pre-treated biologic sample (21a) having sequences of biological material to a device (1000; 2000; 3000) through a fluid inlet (7, 8; 201, 202);

passing the pre-treated biologic sample (21a) through a filtering chamber (6; 207) accommodating a filtering matrix

(5) in presence of adsorption agents, causing adsorption (103) of at least one portion of the sequences on the surface of said filtering matrix (5);
discharging the pre-treated biologic sample (21a) without the
5 portion of the sequences into a discharge chamber (20; 212) of the device (1000; 2000; 3000);
supplying a washing liquid (31a) into the device (1000; 2000; 3000) through the fluid inlet (7, 8; 201, 202);
passing the washing liquid (31a) within the filtering chamber
10 (6; 207), causing washing (105) of said filtering matrix (5);
discharging the washing liquid into the discharge chamber (20; 212);
supplying an eluent liquid (61a) into the device (1000; 2000; 3000) through the fluid inlet (7, 8; 201, 202);
15 passing the eluent liquid (61a) within the filtering chamber (6; 207) and eluting (109) the portion of the sequences in the eluent liquid (61a), to obtain a prepared sample (70); and
passing the prepared sample (70) towards a preparation outlet (218; 18); and
20 loading at least one well (33).

19. The method for preparing a biologic sample according to claim 17, wherein: passing the pre-treated biologic sample (21a) within a filtering chamber (6; 207), discharging the
25 pre-treated biologic sample (21a) into a discharge chamber (20; 212), passing the washing liquid (31a) within the filtering chamber (6; 207), and discharging the washing liquid into the discharge chamber (20; 212) comprise fluidically connecting the filtering chamber (6) to the discharge chamber
30 (20; 212) and generating a negative pressure within the discharge chamber (20; 212) and the filtering chamber (6), and passing the eluent liquid (61a) within the filtering chamber (6; 207) and passing the prepared sample (70) towards a preparation outlet (18; 218) comprise fluidically connecting
35 the filtering chamber (6) to the loading circuit (4, 50, 11;

209, 210, 215) and generating a negative pressure within a loading circuit (4, 50, 11; 209, 210, 215) and the filtering chamber (6).

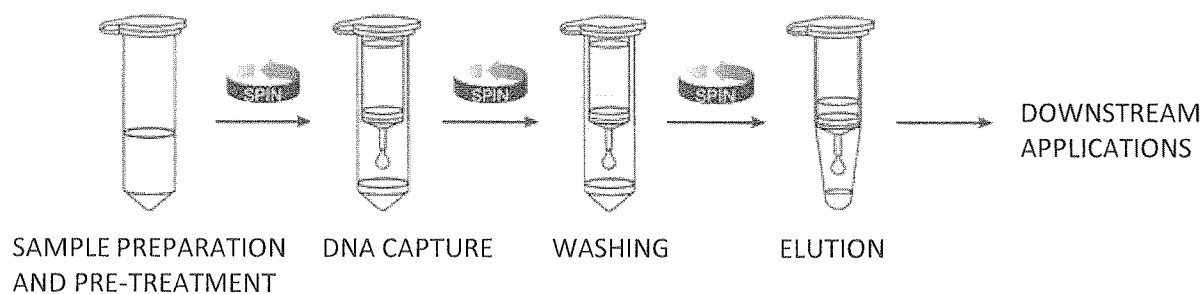


Fig.1

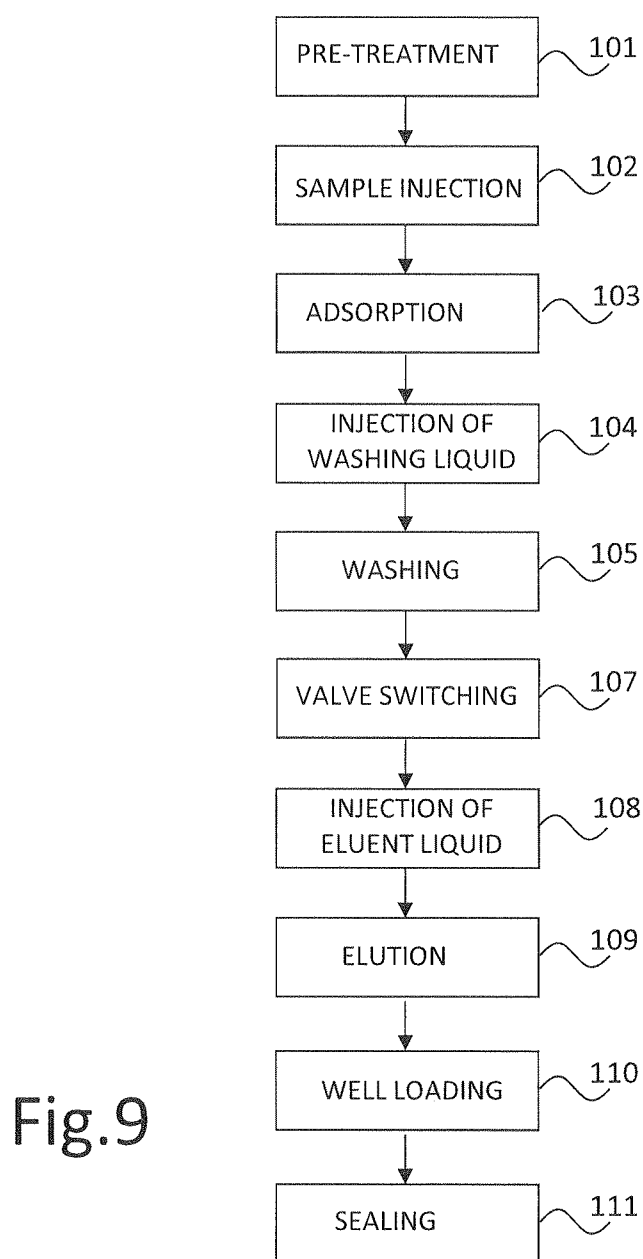


Fig.9

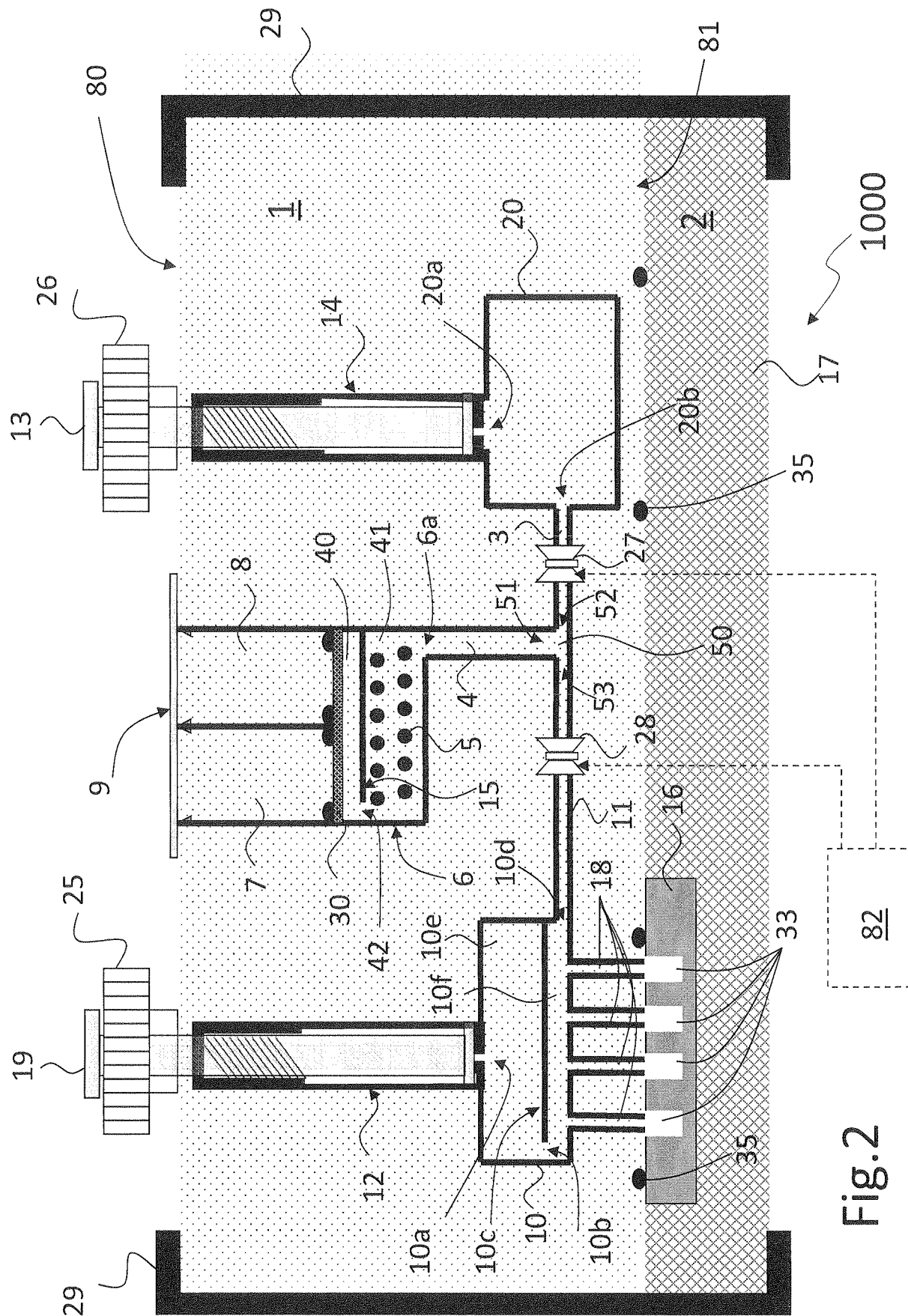
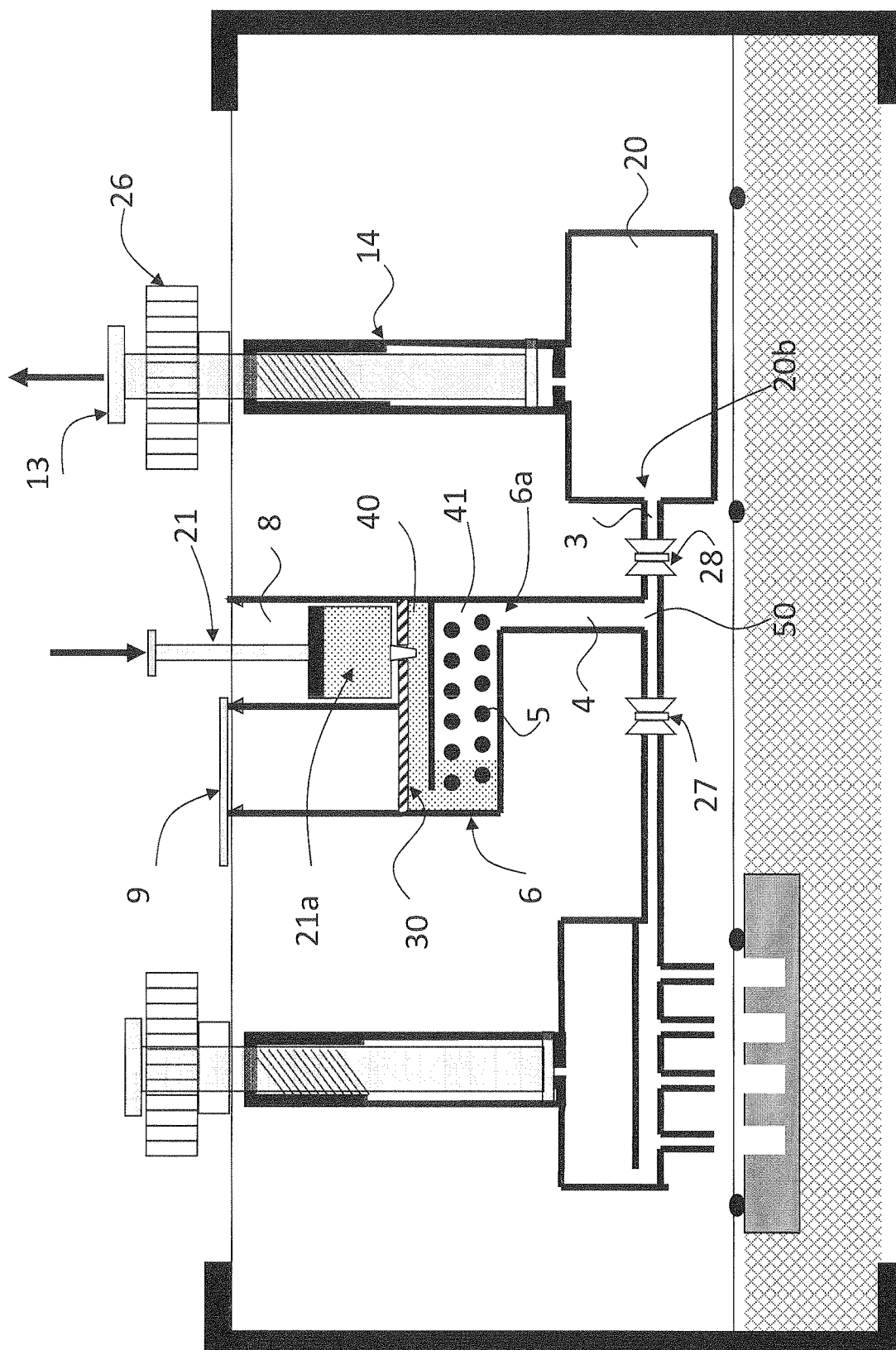


Fig.2



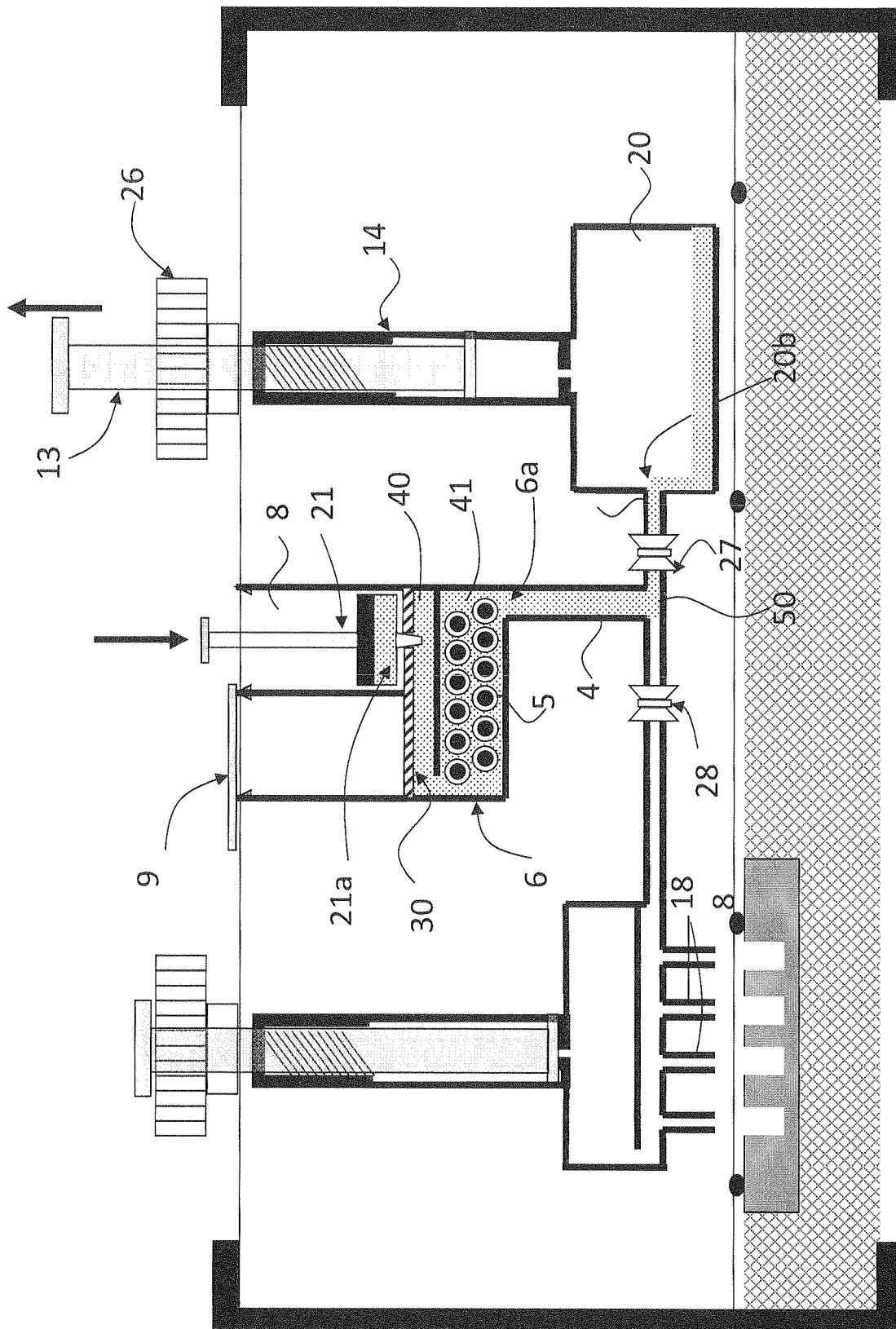


Fig.4

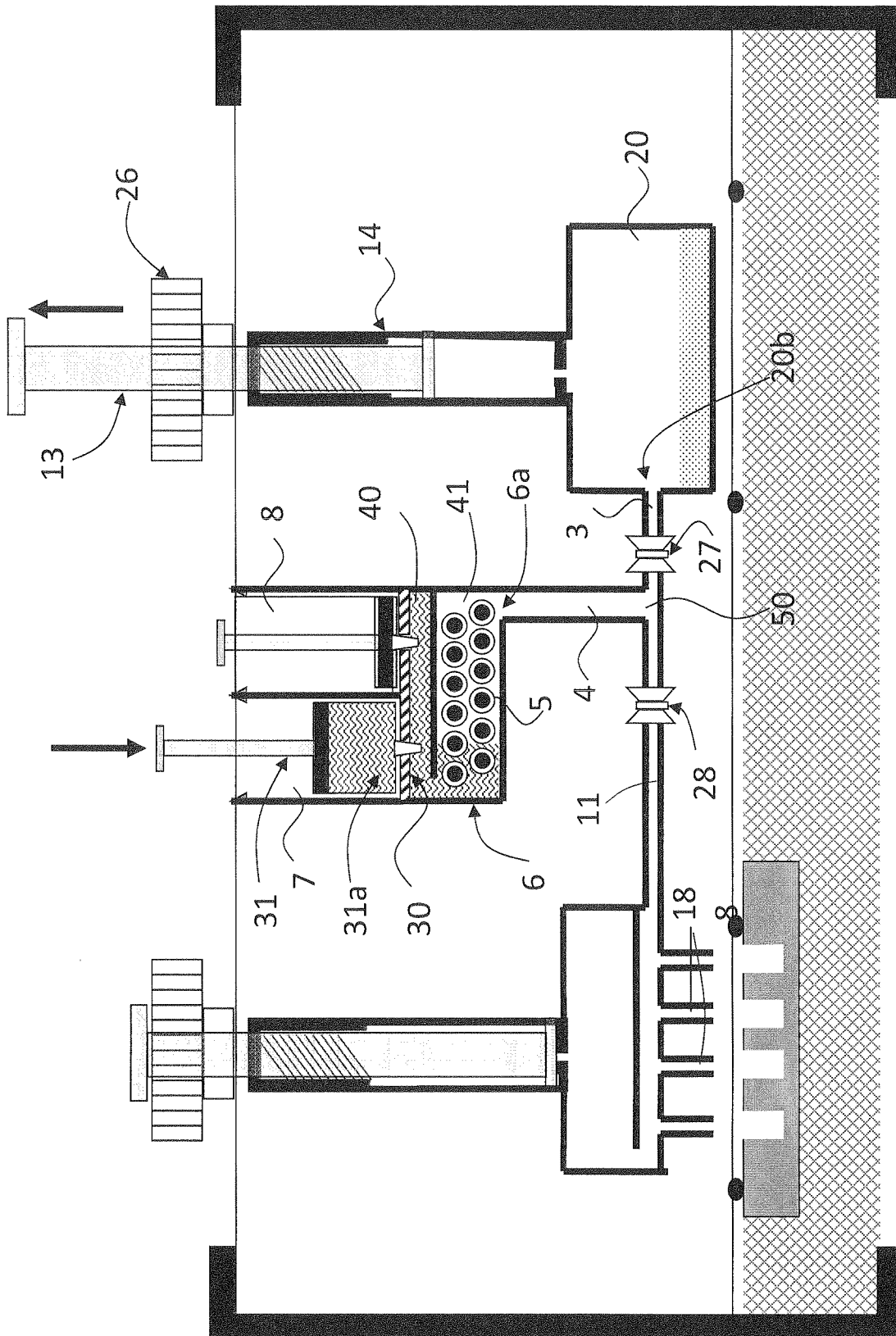


Fig.5

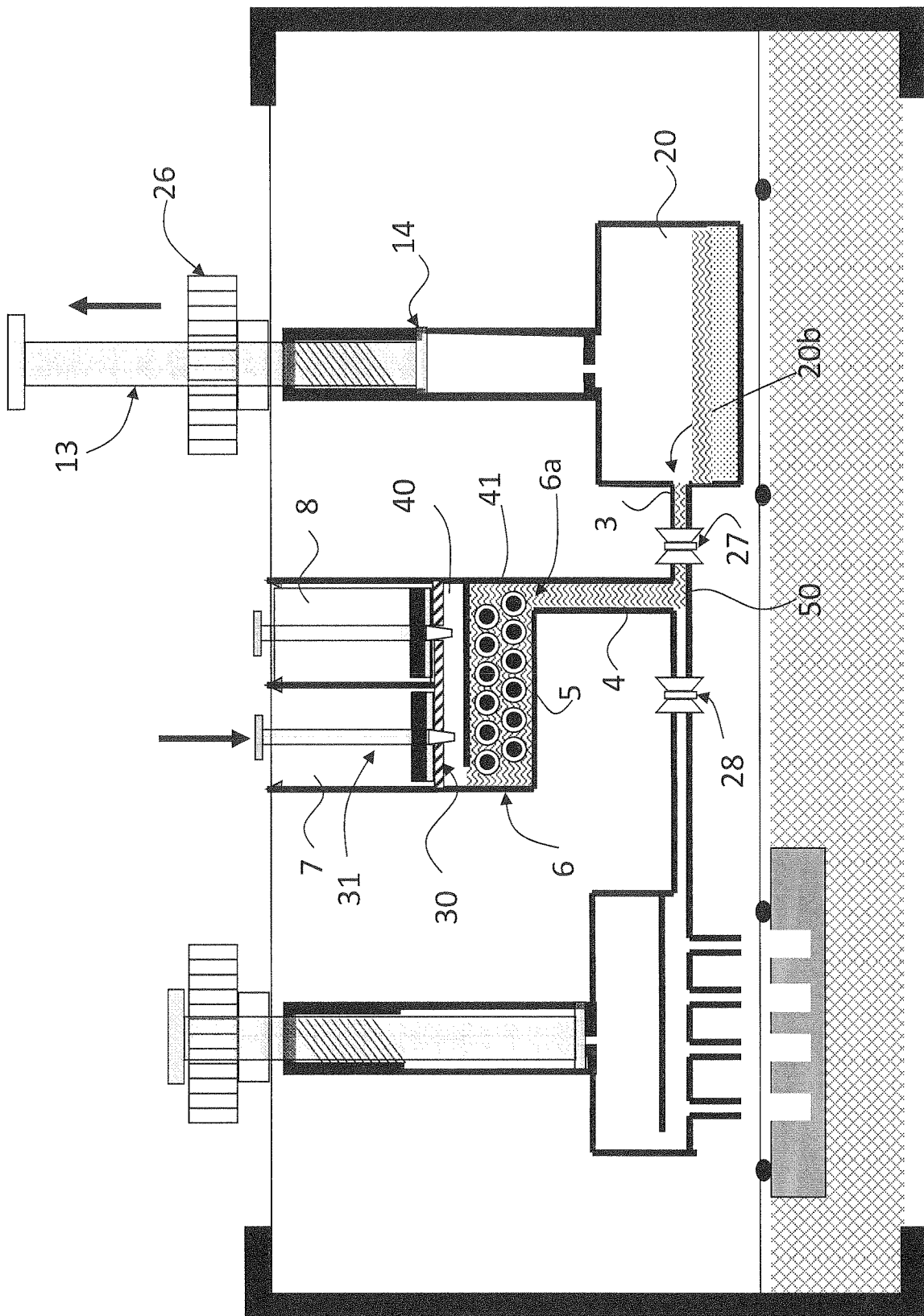


Fig.6

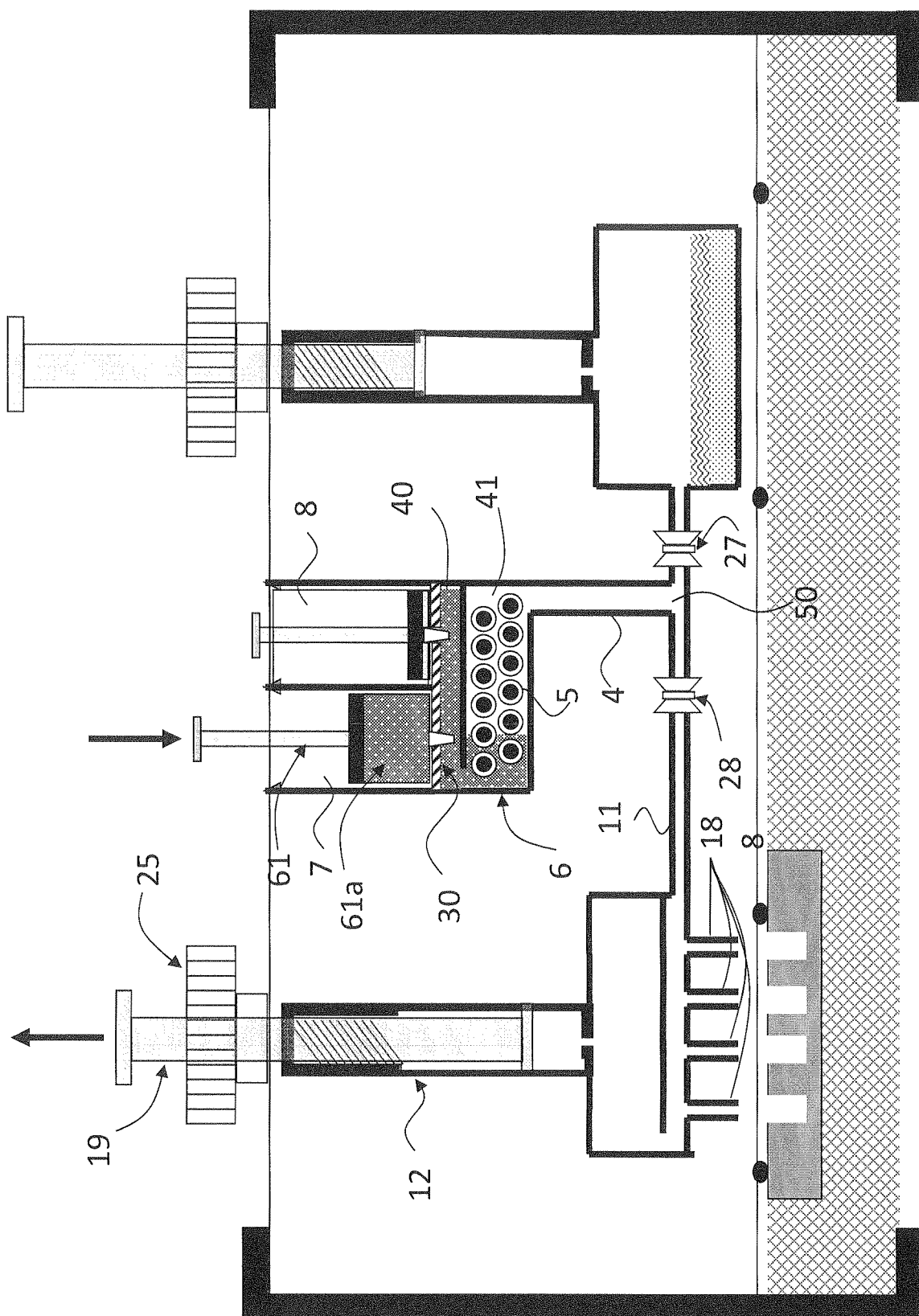


Fig.7

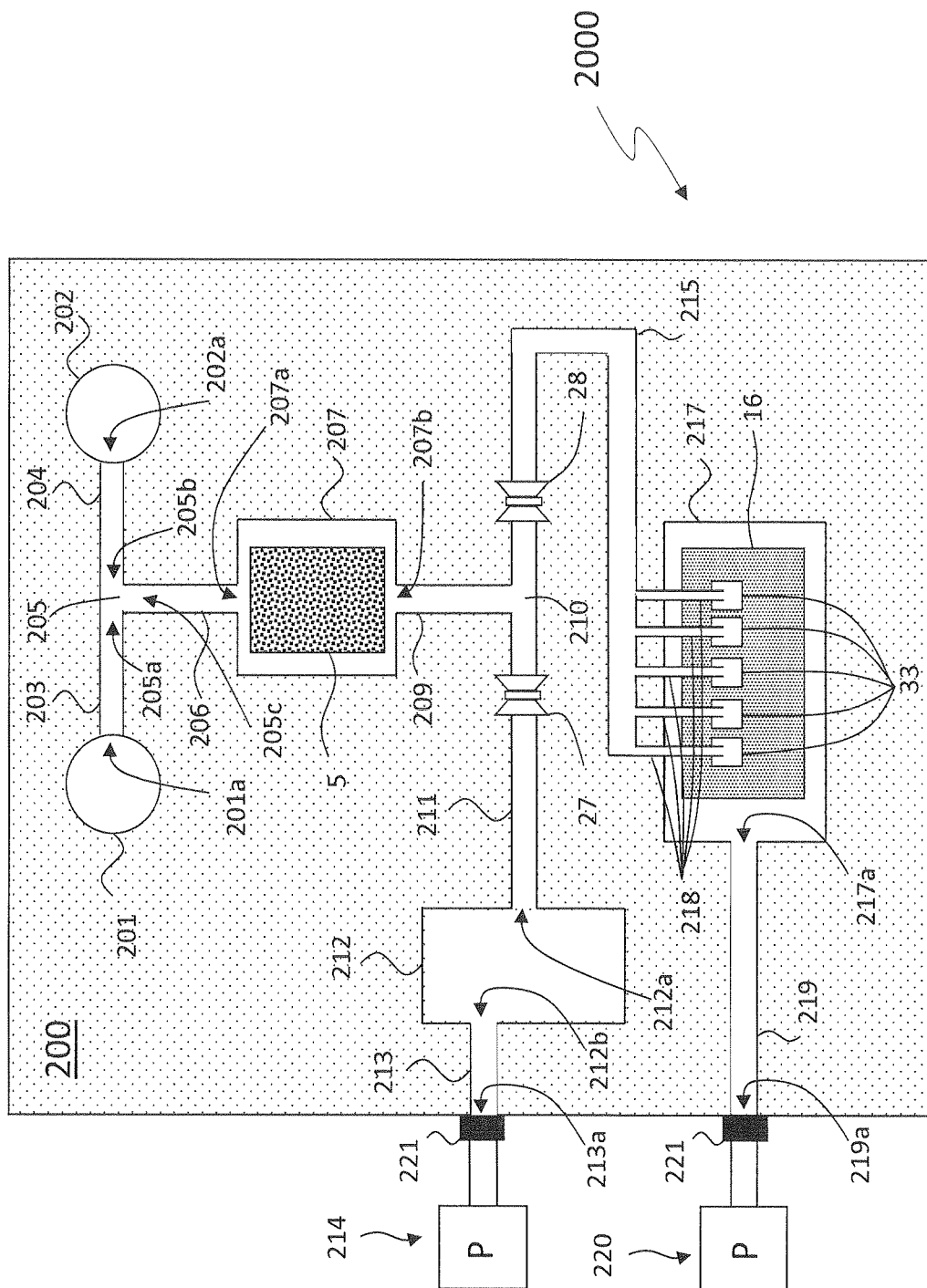


Fig.10

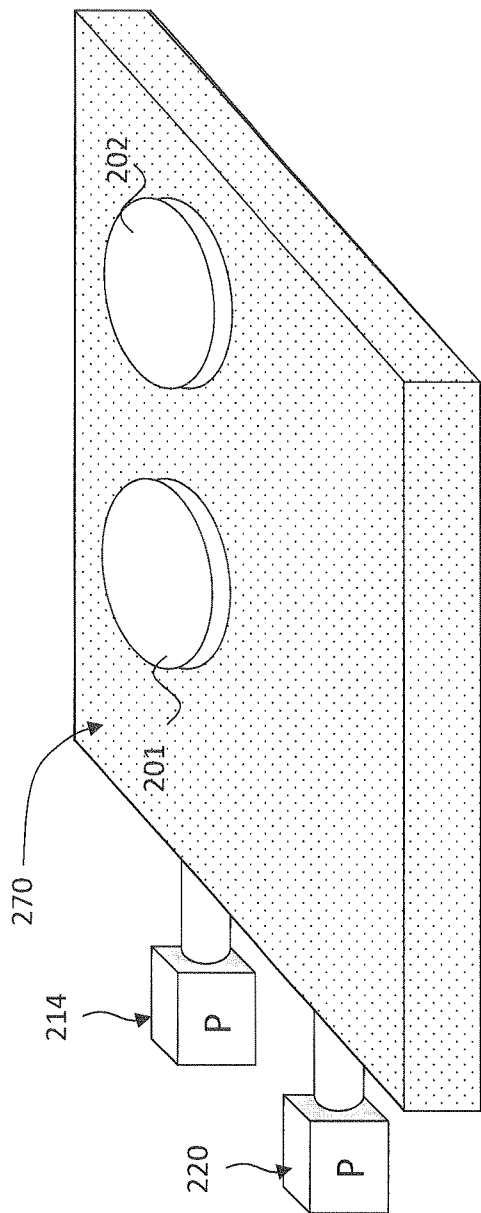


Fig. 11

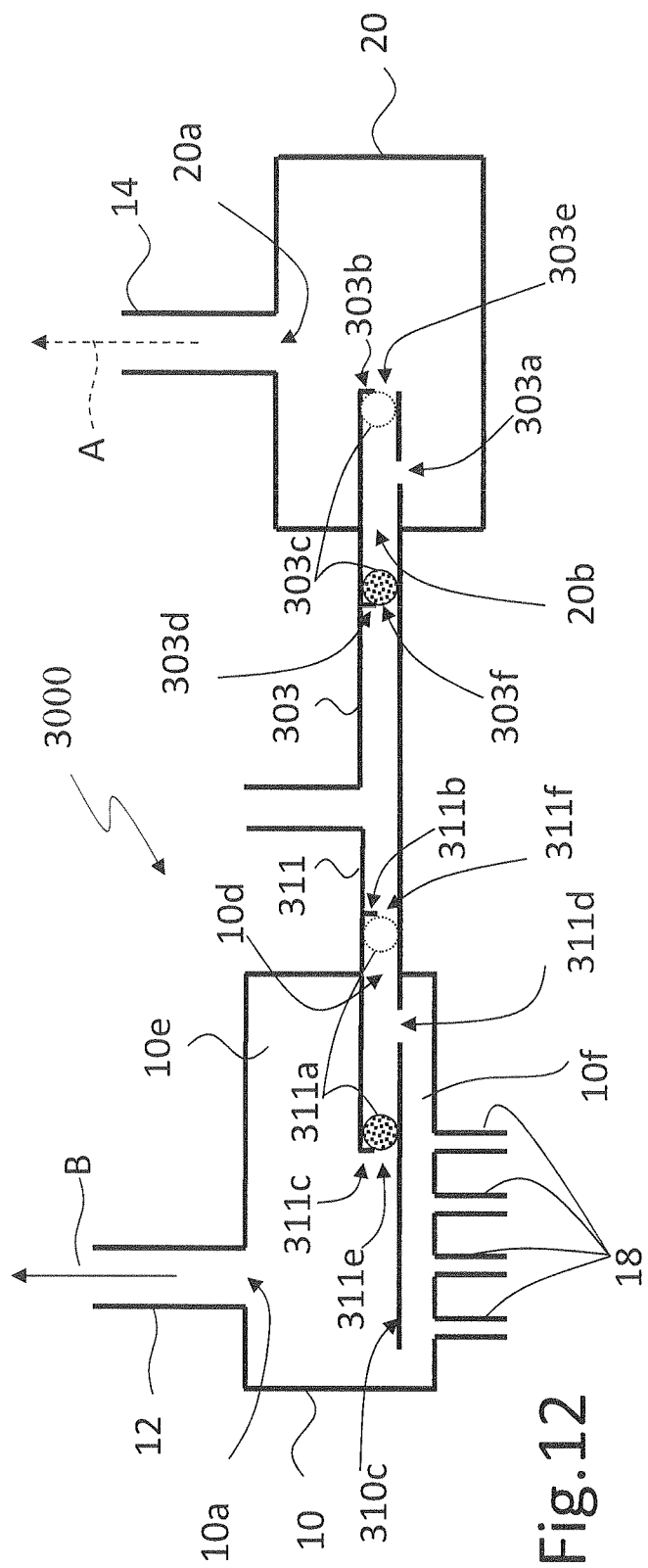


Fig. 12

