

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 859 479**

51 Int. Cl.:

G01N 33/533 (2006.01)

B01L 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.09.2017** **PCT/GB2017/052648**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.03.2018** **WO18046952**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.09.2017** **E 17767910 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.12.2020** **EP 3510400**

54 Título: **Mejoras en o relacionadas con un dispositivo y un método de etiquetado de un componente**

30 Prioridad:

12.09.2016 GB 201615456

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

04.10.2021

73 Titular/es:

**FLUIDIC ANALYTICS LIMITED (100.0%)
Unit A, The Paddock Business Centre Cherry
Hinton Road
Cambridge CB1 8DH, GB**

72 Inventor/es:

**KNOWLES, TUOMAS PERTTI JONATHAN y
DEVENISH, SEAN**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 859 479 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

Mejoras en o relacionadas con un dispositivo y un método de etiquetado de un componente

Esta invención se refiere a mejoras o relativas a un dispositivo de etiquetado de un componente y, en particular, a un dispositivo de etiquetado fluorescente de un componente biológico o químico. La invención también se refiere a un método de etiquetado fluorescente de un componente en una mezcla.

El uso de moléculas fluorescentes en la investigación biológica es popular debido a su versatilidad, sensibilidad y capacidades cuantitativas. Las moléculas fluorescentes, también llamadas fluoróforos, son capaces de absorber luz incidente y emitir luz en una longitud de onda específica diferente de la longitud de onda de absorción, lo que permite la detección sensible de la presencia del fluoróforo.

Para detectar componentes biológicos y/o químicos, estos componentes se marcan por lo general con colorantes fluorescentes. En un ejemplo, la reacción de componentes biológicos con una mezcla que comprende dialdehídos aromáticos, tales como colorante orto-ftaldialdehído (OPA), y un agente reductor tal como β -mercaptoetanol (BME), puede etiquetar los componentes de forma fluorescente. El uso de OPA como agente de etiquetado está bien establecido y se informó por primera vez a principios de la década de 1970. Los colorantes OPA se utilizan a menudo para analizar grupos amino de moléculas biológicas. Más específicamente, OPA produce biomoléculas marcadas con fluorescencia al reaccionar con grupos amina primaria de proteínas o fragmentos de péptidos en presencia de tioles en solución.

Las reacciones de etiquetado de OPA/BME ocurren a pH alto, sin embargo, se sabe que el oxígeno atmosférico provoca que BME se oxide rápidamente y la velocidad de oxidación de BME se eleva a pH alto. Como consecuencia, la vida funcional del colorante reactivo es limitada. Por lo tanto, los experimentos de etiquetado que utilizan la mezcla de OPA/BME solo se pueden realizar durante un corto período de tiempo, es decir, aproximadamente una semana. Izquierdo et al., FRESENIUS JOURNAL OF ANALYTICAL CHEMISTRY, vol. 336, no. 6, 1990, páginas 490-493 describen un método de etiquetado fluorescente de un componente en una mezcla haciéndolo reaccionar con OPA/BME en un sistema de flujo. Después de la formación in situ del reactivo de etiquetado, se hace reaccionar con el compuesto en una muestra combinándolo en los conductos de un sistema de flujo. OPA y BME se mantienen en solución reguladora de ácido bórico a pH 9.5.

La corta vida útil de la mezcla OPA/BME puede ser problemática para los experimentos de etiquetado que se realizan en una ubicación remota, tal como un dispositivo operado por el usuario que puede no ser operado inmediatamente. Asimismo, la provisión de una solución de colorante OPA reactivo que no requiera que el usuario agregue manualmente BME poco antes de su uso no es práctica.

Es en este contexto que ha surgido la invención.

Según la presente invención, se proporciona un método de etiquetado fluorescente de un componente en una mezcla, comprendiendo el método las etapas de

a) proporcionar una solución alcalina fuertemente regulada de colorante orto-dialdehído aromático en un primer depósito;

b) proporcionar, en un segundo depósito, una solución ácida débilmente regulada en presencia de tioles en la solución proporcionada por un agente reductor y que comprende además un aditivo antioxidante configurado para estabilizar el agente reductor;

c) proporcionar un componente en una vía de fluido, en el que la vía de fluido está conectada al primer y segundo depósitos por una red de canales de conexión;

d) hacer fluir la solución alcalina y la solución ácida a través de la red de canales de conexión para combinar con el componente con el fin de etiquetar el componente haciendo reaccionar el componente con el colorante orto-dialdehído aromático y el agente reductor.

El almacenamiento del colorante orto-dialdehído aromático y el agente reductor en depósitos separados permite optimizar las condiciones experimentales en cada depósito antes de mezclar el colorante orto-dialdehído aromático y el agente reductor juntos. Por ejemplo, la solución alcalina fuertemente regulada en el primer depósito se proporciona a un pH alto, que es apropiado para una reacción de etiquetado.

Por el contrario, la solución ácida débilmente regulada en el segundo depósito está optimizada para tener un pH bajo, lo que reduce la tasa de oxidación del agente reductor provocada por el aire atmosférico.

En algunas realizaciones, la etapa (d) puede comprender combinar la solución alcalina y la solución ácida y, posteriormente, hacer reaccionar el componente con la solución alcalina y la solución ácida.

En otras realizaciones, la etapa (d) puede comprender combinar la solución alcalina con el componente y posteriormente introducir la solución ácida.

En algunas realizaciones, la etapa (d) puede comprender combinar la solución ácida con el componente y posteriormente introducir la solución alcalina.

- 5 La solución alcalina fuertemente regulada y la solución ácida débilmente regulada se pueden combinar para proporcionar un pH total de una solución alcalina. El pH total de una solución alcalina puede proporcionar las condiciones apropiadas para el etiquetado fluorescente de un componente.

En algunas realizaciones, la solución ácida puede aumentar la vida funcional del agente reductor hasta de 50 a 100 días, o puede exceder los 40, 60, 80 o 100 días.

- 10 En algunas realizaciones, la solución ácida puede aumentar la vida funcional del agente reductor en menos de 100, 80, 60 o 40 días. Preferiblemente, la solución ácida aumenta la vida funcional del agente reductor alrededor de 75 días.

- 15 El método descrito por la presente invención puede comprender además proporcionar un aditivo antioxidante, que está configurado para estabilizar el agente reductor. La adición del aditivo antioxidante puede aumentar la vida funcional del agente reductor alrededor de 500 y 1000 días, o puede aumentar la vida funcional del agente reductor en 200, 300, 400, 500, 600 u 800 días. En algunas realizaciones, el aditivo puede aumentar la vida funcional del agente reductor en menos de 1000, 800, 600, 400, 200 o 100 días. Preferiblemente, la adición del aditivo antioxidante aumenta la vida funcional del agente reductor en aproximadamente 500 días.

- 20 En algunas realizaciones, la solución ácida puede tener un intervalo de pH entre 1 a 7, 2 a 6, 3 a 6, 4 a 6 o 5 a 6. Preferiblemente, el intervalo de pH de la solución ácida es 2 a 6.

En algunas realizaciones, la solución alcalina puede tener un intervalo de pH entre 7 a 14, 8 a 14, 9 a 14, 10 a 14, 11 a 14, 12 a 14 o 13 a 14. Preferiblemente, el intervalo de pH de la solución alcalina es de 8 a 14.

- 25 El componente puede ser un componente biológico o químico. Por ejemplo, el componente biológico o químico puede ser un péptido, una proteína o un ácido nucleico. En algunas realizaciones, el componente puede ser un grupo amina de una proteína o un péptido.

En algunas realizaciones, el colorante orto-dialdehído aromático es un colorante de orto-ftaldialdehído (OPA). Los colorantes OPA son colorantes fluorescentes sensibles, que se pueden usar para analizar grupos amina en solución, especialmente en fragmentos de péptidos, proteínas y aminoácidos.

- 30 En algunas realizaciones, el agente reductor puede ser β -mercaptoetanol (BME). BME se puede usar para reaccionar con OPA de manera eficiente.

El aditivo se puede seleccionar entre ascorbato, isoascorbato, lactato o una sal de lactato. Preferiblemente, el aditivo es una sal de lactato.

Según otro aspecto de la invención, se proporciona un dispositivo de etiquetado fluorescente de un componente, comprendiendo el dispositivo,

- 35 a) un primer depósito reemplazable por el usuario que comprende una solución alcalina fuertemente regulada de colorante orto-dialdehído aromático,

b) un segundo depósito reemplazable por el usuario que comprende una solución ácida débilmente regulada en presencia de tioles en solución proporcionada por un agente reductor y que comprende además un aditivo antioxidante configurado para estabilizar el agente reductor,

- 40 c) una o más vías de fluido que comprenden el componente, y

d) una red de canales de conexión que unen los depósitos y la vía de fluido para permitir que la solución alcalina y la solución ácida se combinen con el componente con el fin de etiquetar el componente haciendo reaccionar el componente con la solución alcalina y la solución ácida.

- 45 La red de canales de conexión se puede configurar para combinar la solución alcalina y la solución ácida antes de combinar la mezcla resultante con el componente.

En algunas realizaciones, la red de canales de conexión se puede configurar para combinar la solución alcalina con el componente antes de combinar la mezcla resultante con la solución ácida.

En otras realizaciones, la red de canales de conexión se puede configurar para combinar la solución ácida con el componente antes de combinar la mezcla resultante con la solución alcalina.

El segundo depósito puede comprender además un aditivo antioxidante configurado para estabilizar el agente reductor.

5 En algunas realizaciones, el segundo depósito puede ser impermeable al gas. En algunas realizaciones, el primer depósito puede ser impermeable a la luz. Los depósitos impermeables a la luz y al gas proporcionados pueden ser ventajosos ya que pueden mejorar la vida de almacenamiento del reactivo.

La red de canales de conexión puede estar provista de una o más válvulas unidireccionales, que se pueden usar para evitar el flujo inverso de la solución alcalina y/o la solución ácida

10 En algunas realizaciones, la resistencia hidrodinámica aguas abajo de cada canal de conexión puede ser sustancialmente igual de modo que las velocidades de flujo de las soluciones desde el primer y segundo depósitos hacia las vías de fluido sean sustancialmente iguales.

En algunas realizaciones, la resistencia hidrodinámica aguas abajo de cada canal de conexión puede ser sustancialmente diferente, de modo que las velocidades de flujo de las soluciones desde el primer y segundo depósitos hacia las vías de fluido son sustancialmente diferentes.

Preferiblemente, las vías de fluido se proporcionan en un dispositivo de microfluidos.

15 La invención se describirá ahora con más detalle y en particular, a modo de ejemplo únicamente, y con referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

La figura 1a proporciona una descripción general de un dispositivo según la presente invención.

La figura 1b ilustra una realización adicional del dispositivo según la figura 1a,

La figura 2 muestra la actividad funcional de BME en condiciones ácidas,

20 La figura 3 proporciona datos que muestran los efectos de la oxidación de BME, y

La figura 4 muestra la inhibición de la oxidación de BME por un aditivo antioxidante.

25 Con referencia a las figuras 1a y 1b, se proporciona un dispositivo 10 para etiquetado fluorescente de un componente. El dispositivo 10 comprende un primer depósito 12 que comprende una solución alcalina fuertemente regulada de colorante orto-dialdehído aromático tal como OPA, y un segundo depósito 14 que comprende una solución ácida débilmente regulada de un agente reductor, por ejemplo, BME. El primer y segundo depósitos pueden formar un cartucho de reactivo que un usuario puede acoplar a los canales de conexión.

30 Se puede preparar una solución alcalina fuertemente regulada a una concentración de entre 100 mM y 1000 mM. Además, la solución ácida débilmente regulada se puede preparar a una concentración de entre 0.5 mM y 50 mM. El colorante orto-dialdehído aromático se puede preparar a una concentración entre 0.5 mM y 20 mM. Además, el agente reductor se puede preparar a una concentración de 1 a 50 mM.

35 Con referencia a las figuras 1a y 1b, los depósitos proporcionan una barrera impermeable. El primer depósito es impermeable a la luz y el segundo depósito es impermeable al gas, lo que puede ayudar a aumentar el almacenamiento o la vida útil de los reactivos dentro de los depósitos. Los depósitos evitan que la solución ácida se mezcle con la solución alcalina antes de su uso. Los depósitos están hechos con una película aluminizada, tal como un recubrimiento/bolsa con revestimiento de aluminio u otras capas de barrera.

Se agrega un aditivo antioxidante al segundo depósito que estabiliza el BME alrededor de 500 a 1000 días. La concentración de los aditivos antioxidantes agregados al depósito varía desde 0.5 mM a 100 mM. El aditivo antioxidante puede ser una sal de lactato, tal como un lactato de potasio o un lactato de sodio.

40 El dispositivo comprende además una o más vías 16 de fluido, que está configurado para comprender un componente tal como un componente biológico o químico. El componente biológico o químico puede ser una proteína, péptido o ácido nucleico. Se pueden proporcionar una o más vías de fluido en un dispositivo fluido tal como un dispositivo microfluídico.

45 Como se ilustra en las figuras 1a y 1b, el dispositivo 10 proporciona una red 18 de canales de conexión. La red 18 de canales de conexión está configurada para permitir la combinación de la solución ácida, la solución alcalina y el componente. Haciendo referencia a las figuras 1a y 1b, la red 18 de canales de conexión está configurada para unir el primer depósito 12, el segundo depósito 14 y la vía 16 de fluido juntos para permitir que la solución alcalina, la solución ácida y el componente se combinen.

50 La red de canales de conexión se puede usar para combinar el flujo de la solución alcalina y el flujo de la solución ácida antes de combinar la mezcla resultante con el componente. Alternativamente, la red de canales de conexión se puede usar para combinar el flujo de la solución alcalina con el componente antes de combinar la mezcla resultante con el flujo de la solución ácida. Alternativamente, la red de canales de conexión se puede configurar para combinar

el flujo de la solución ácida con el componente antes de combinar la mezcla resultante con el flujo de la solución alcalina.

La solución alcalina fuertemente regulada en el primer depósito 12 y la solución ácida débilmente regulada en el segundo depósito 14 se combinan juntas para proporcionar un pH total de una solución alcalina. El alto pH de la solución combinada puede proporcionar las condiciones apropiadas para un etiquetado fluorescente eficaz del componente.

El etiquetado del componente se produce haciendo reaccionar el componente con la solución alcalina y la solución ácida. Más específicamente, el etiquetado del componente se produce haciendo reaccionar el componente con el colorante orto-dialdehído aromático y el agente reductor. Por ejemplo, la combinación de OPA y BME se puede usar para etiquetar con fluorescencia el grupo amina de una molécula biológica tal como un péptido o una proteína. Más explícitamente, la combinación de OPA y BME se puede usar para etiquetar de manera fluorescente el grupo amina de un residuo de lisina y/o la amina N-terminal de una cadena peptídica.

Como se ilustra en las figuras 1a y 1b, la red 18 de canales de conexión está provista de una o más válvulas unidireccionales, que están configuradas para evitar el flujo inverso de la solución alcalina y/o la solución ácida. Por ejemplo, las válvulas unidireccionales pueden evitar el flujo de la solución alcalina y/o ácida desde los canales de conexión, las vías de fluido o ambos, hacia el primer y segundo depósitos.

Las resistencias hidrodinámicas de cada canal de conexión vienen dictadas por la geometría del canal de conexión, tal como el área de la sección transversal del canal, la longitud del canal y la rugosidad de la superficie del canal.

La resistencia hidrodinámica aguas abajo de cada canal de conexión puede ser sustancialmente igual de modo que las velocidades de flujo de las soluciones desde el primer y segundo depósitos hacia las vías de fluido sean sustancialmente iguales. Esto puede proporcionar un flujo continuo de las soluciones desde el primer y segundo depósitos hacia las vías de fluido. Alternativamente, la resistencia hidrodinámica corriente abajo de cada canal de conexión puede ser sustancialmente diferente de modo que las velocidades de flujo de las soluciones desde el primer y segundo depósitos hacia las vías de fluido sean sustancialmente diferentes.

Con referencia a la figura 2, hay datos que muestran la función de BME a diferentes niveles de acidez en la reacción de etiquetado de OPA. El experimento que se muestra en la figura 2 investigó el efecto de reducir el pH de la solución de BME sobre la vida útil de almacenamiento a largo plazo de BME. Se puede preparar una serie de soluciones de BME (12 mM en agua) y estas soluciones se pueden acidificar con concentraciones variables de ácido acético agregado, de 0.1 M a 1 uM, cubriendo un intervalo de pH desde ~2 a ~6.

También se pueden preparar dos muestras de control que no contengan ácido agregado (es decir, solo agua. Las soluciones se pueden almacenar en microtubos no herméticos a los gases en la oscuridad y probar su función periódicamente durante cinco meses probando el rendimiento de fluorescencia cuando reaccionan con albúmina de suero bovino (BSA, 330 nM) y OPA. Los resultados de la figura 2 ilustran que la solución de BME acidificada proporciona una reacción constante hasta aproximadamente 75 días, después de lo cual se vuelve más errática con una tendencia generalmente decreciente en la actividad funcional. También se encontró, aunque no se ilustra en las figuras adjuntas, que el reactivo BME de pH alto permanece activo durante aproximadamente siete días dependiendo de las condiciones exactas.

Con referencia a la figura 3, los datos muestran los efectos de la oxidación de BME sobre la función de un colorante fluorescente. El experimento ilustrado en la figura 3 investigó el efecto de grados conocidos de oxidación de BME sobre la función del colorante OPA. Se puede preparar una serie de soluciones de BME combinando BME fresco con disulfuro de 2-hidroxietilo (HED) en proporciones variables para producir una serie de soluciones de BME con grados de oxidación conocidos. La función de estas soluciones se puede determinar luego etiquetando albúmina de suero bovino (BSA, 330 nM, 50 uL) con las soluciones de prueba BME (25 uL) y OPA (3 mM, 25 uL) y midiendo la fluorescencia del producto.

Los datos de la figura 3 muestran que se tolera la oxidación de BME de hasta aproximadamente el 80% antes de que el rendimiento del colorante fluorescente disminuya significativamente. En algunos casos, el rendimiento del colorante fluorescente también puede ser sensible a la concentración de la amina que se está etiquetando. Un experimento posterior (no ilustrado en los dibujos) usando BSA más concentrado (4 uM) indicó resultados similares, con un 75% de BME oxidada dando el mismo nivel de fluorescencia que un 0% de BME oxidada. El siguiente nivel más alto de oxidación probado, al 90%, mostró una caída significativa en la fluorescencia.

Con referencia a la tabla 1, se muestran datos experimentales que demuestran la tasa de oxidación de BME en presencia de un aditivo antioxidante. Se puede mezclar una serie de antioxidantes (5 y 50 mM) con el BME y probar su compatibilidad con la reacción de etiquetado OPA. Las reacciones consistieron en 50 uL de muestra (proteína, albúmina de suero bovino (BSA) o amina pequeña, N-acetililisina (NAK)), 25 uL de solución de OPA y 25 uL de solución de BME.

Se puede seleccionar un antioxidante sobre la base de que no cambia significativamente la fluorescencia medida frente a una muestra de prueba, que se puede definir como una variación inferior al 10%; y/o no ralentiza de forma apreciable la reacción, lo que puede definirse como ningún retraso en alcanzar la fluorescencia máxima cuando se realizan mediciones manuales en un lector de placas, donde la primera lectura se toma aproximadamente 15 segundos después de la mezcla.

5

Amina	Antioxidante	Conc (mM)	Fluorescencia Max	Tiempo a max	Fluorescencia a t=0 s	Fluorescencia a t=120 s
NAK	Ninguno	0	7180	0	7180	6510
	(DMSO cont)	0	10000	0	10000	9050
	Ácido ascórbico	50	6690	0	6690	5990

	Ácido ascórbico	5	7300	0	7300	6470
	a-tocoferol	50	4400	0	4400	4220
	a-tocoferol	5	5620	0	5620	5370
	Ácido isoascórbico	50	6330	10.3	6130	6000
	Ácido isoascórbico	5	7000	0	7000	6370
	Lactato de sodio	50	7120	0	7120	6400
	Lactato de sodio	5	7120	0	7120	6420
	Ácido cítrico	50	6570	70	3830	6440
	Ácido cítrico	5	7230	0	7230	6500
	Azida de sodio	50	6870	0	6870	6240
	Azida de sodio	5	7010	4.2	6970	6420
	Melatonina	50	10400	0	10400	9610
	Melatonina	5	9830	0	9830	9270
BSA	Ninguno	0	5080	0	5080	4910
	(DMSO cont)	0	5830	0	5830	5100
	Ácido ascórbico	50	4410	91	4190	4400
	Ácido ascórbico	5	5620	0	5620	5100
	a-tocoferol	50	3460	0	3460	3390
	a-tocoferol	5	4830	81	4280	4790
	Ácido isoascórbico	50	4800	15	4520	4580
	Ácido isoascórbico	5	5150	0	5150	4610
	Lactato de sodio	50	5480	80	5160	5270
	Lactato de sodio	5	6210	82	5910	6110
	Ácido cítrico	50	4620	120	3010	4620
	Ácido cítrico	5	5180	69	5050	4660
	Azida de sodio	50	5430	0	5430	5020

Azida de sodio	5	5320	0	5320	4930
Melatonina	50	7280	0	7280	6320
Melatonina	5	6560	0	6560	5490

- La capacidad de los antioxidantes que se ha encontrado que son compatibles con la reacción del colorante OPA/BME para prevenir la oxidación de BME en las condiciones requeridas se puede analizar mediante espectrometría de resonancia magnética nuclear (RMN). Se pueden preparar muestras de BME en AcOH/D₂O 10 μ M (5 μ L en 10 μ L D₂O) o en una concentración más alta para análisis de RMN. Se pueden preparar muestras de BME que comprendan diferentes aditivos antioxidantes, por ejemplo; se pueden preparar ascorbato, isoascorbato y lactato a concentraciones de 5 mM y 50 mM. Las muestras se pueden almacenar en tubos de RMN de vidrio que estén tapados con tapas de plástico ajustadas (pero no impermeables a los gases). Alternativamente, las muestras se pueden almacenar en tubos Shigemi, tubos de RMN de 3 mm, 5 mm o 10 mm. A continuación, las muestras se pueden colocar en un instrumento de RMN para medir y producir espectros de RMN, tal como espectros 1D, 2D o 3D. Los experimentos se pueden realizar en un instrumento de RMN de 400, 600 u 800 MHz.

- Como se ilustra en la figura 4, el lactato muestra la mayor inhibición de la oxidación de BME seguido por el isoascorbato, mientras que el ascorbato muestra la menor inhibición de la oxidación. La concentración más baja de antioxidante (5 mM) muestra un mejor rendimiento que la concentración más alta (50 mM) en todos los casos.
- Los expertos en la técnica apreciarán además que, aunque la invención se ha descrito a modo de ejemplo con referencia a varias realizaciones, no se limita a las realizaciones descritas y que podrían construirse realizaciones alternativas sin apartarse del alcance de la invención como se define en las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un método de etiquetado fluorescente de un componente en una mezcla, comprendiendo el método las etapas de
 - a) proporcionar una solución alcalina fuertemente regulada de colorante orto-dialdehído aromático en un primer depósito;
- 5 b) proporcionar, en un segundo depósito, una solución ácida débilmente regulada en presencia de tioles en solución proporcionada por un agente reductor y que comprende además un aditivo antioxidante configurado para estabilizar el agente reductor;
- c) proporcionar un componente en una vía de fluido, en el que la vía de fluido está conectada al primer y segundo depósitos mediante una red de canales de conexión;
- 10 d) hacer fluir la solución alcalina y la solución ácida a través de la red de canales de conexión para combinar con el componente con el fin de etiquetar el componente haciendo reaccionar el componente con el colorante orto-dialdehído aromático y el agente reductor.
2. El método según la reivindicación 1, en el que la etapa (d) comprende combinar la solución alcalina y la solución ácida y posteriormente hacer reaccionar el componente con la solución alcalina y la solución ácida.
- 15 3. El método según la reivindicación 1, en el que la etapa (d) comprende combinar la solución alcalina con el componente y posteriormente introducir la solución ácida.
4. El método según la reivindicación 1, en el que la etapa (d) comprende combinar la solución ácida con el componente y posteriormente introducir la solución alcalina.
- 20 5. El método según la reivindicación 1, en el que el componente es un péptido, una proteína o un ácido nucleico o un grupo amina de una proteína o un péptido.
6. El método según la reivindicación 1, en el que el colorante orto-dialdehído aromático es OPA.
7. El método según la reivindicación 1, en el que el agente reductor es BME.
8. El método según la reivindicación 1, en el que el aditivo se selecciona entre ascorbato, isoascorbato, lactato o una sal de lactato.
- 25 9. Un dispositivo para el etiquetado fluorescente de un componente, comprendiendo el dispositivo,
 - a) un primer depósito reemplazable por el usuario que comprende una solución alcalina fuertemente regulada de colorante orto-dialdehído aromático,
 - b) un segundo depósito reemplazable por el usuario que comprende una solución ácida débilmente regulada en presencia de tioles en solución proporcionada por un agente reductor y que comprende además un aditivo antioxidante configurado para estabilizar el agente reductor,
- 30 c) una o más vías de fluido que comprenden el componente, y
 - d) una red de canales de conexión que unen los depósitos y la vía de fluido para permitir que la solución alcalina y la solución ácida se combinen con el componente con el fin de etiquetar el componente haciendo reaccionar el componente con la solución alcalina y la solución ácida.
- 35 10. El dispositivo según la reivindicación 9, en el que la red de canales de conexión está configurada para combinar la solución alcalina y la solución ácida antes de combinar la mezcla resultante con el componente.
11. En dispositivo según la reivindicación 9, en el que la red de canales de conexión está configurada para combinar la solución alcalina con el componente antes de combinar la mezcla resultante con la solución ácida.
- 40 12. El dispositivo según la reivindicación 9, en el que la red de canales de conexión está configurada para combinar la solución ácida con el componente antes de combinar la mezcla resultante con la solución alcalina.
13. El dispositivo según la reivindicación 10, en el que el segundo depósito es impermeable al gas.
14. El dispositivo según la reivindicación 9, en el que el primer depósito es impermeable a la luz.
15. El dispositivo según la reivindicación 9, en el que la red de canales de conexión está provista de una o más válvulas unidireccionales para evitar el flujo inverso de la solución alcalina y/o la solución ácida.

16. El dispositivo según la reivindicación 9, en el que la resistencia hidrodinámica aguas abajo de cada canal de conexión es sustancialmente igual, de modo que las velocidades de flujo de las soluciones desde el primer y segundo depósitos hacia las vías de fluido son sustancialmente iguales.
- 5 17. El dispositivo según la reivindicación 9, en el que la resistencia hidrodinámica aguas abajo de cada canal de conexión es sustancialmente diferente, de modo que las velocidades de flujo de las soluciones desde el primer y segundo depósitos hacia las vías de fluido son sustancialmente diferentes.

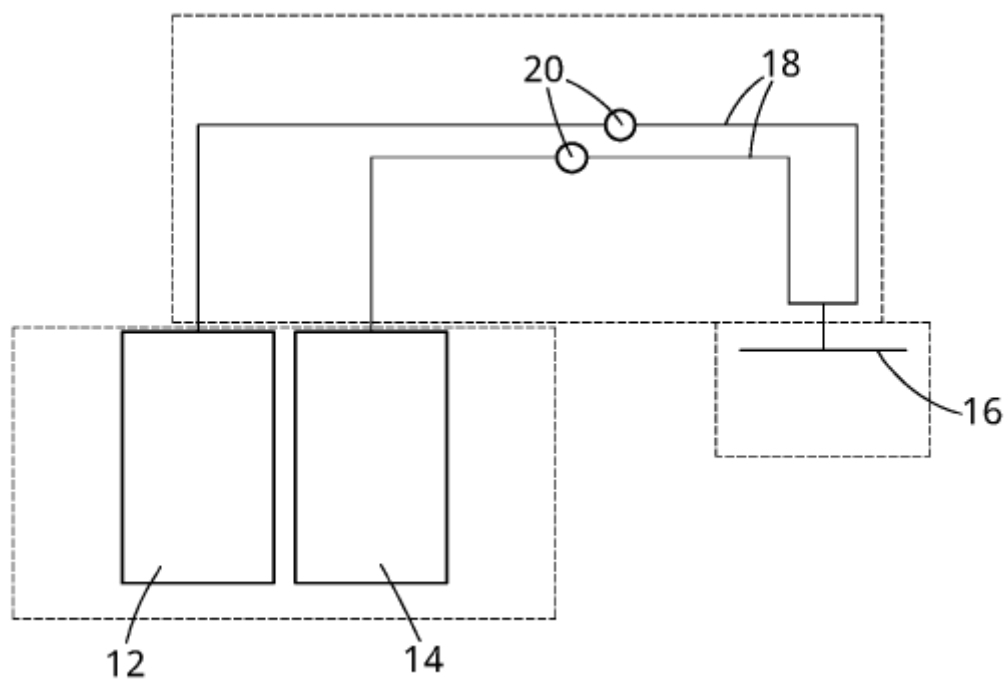


Fig. 1a

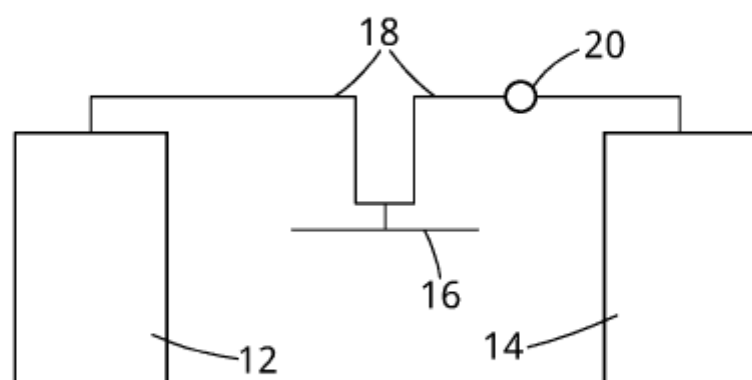


Fig. 1b

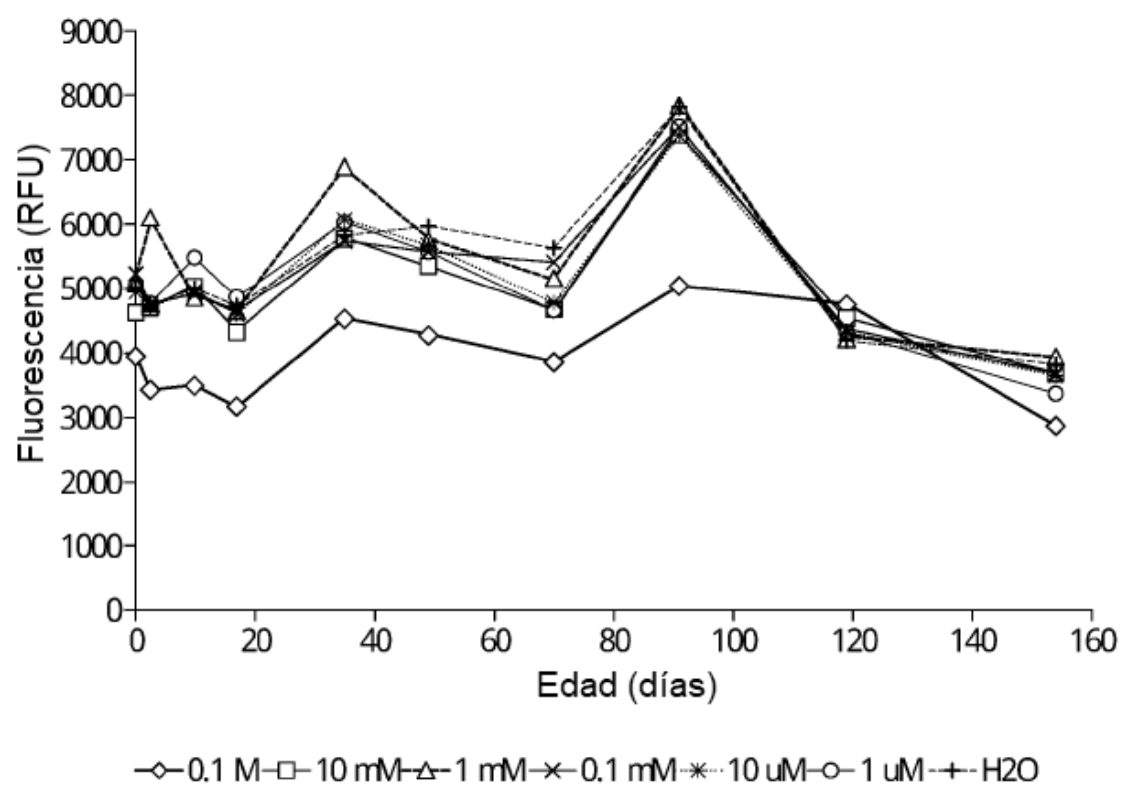


Fig. 2

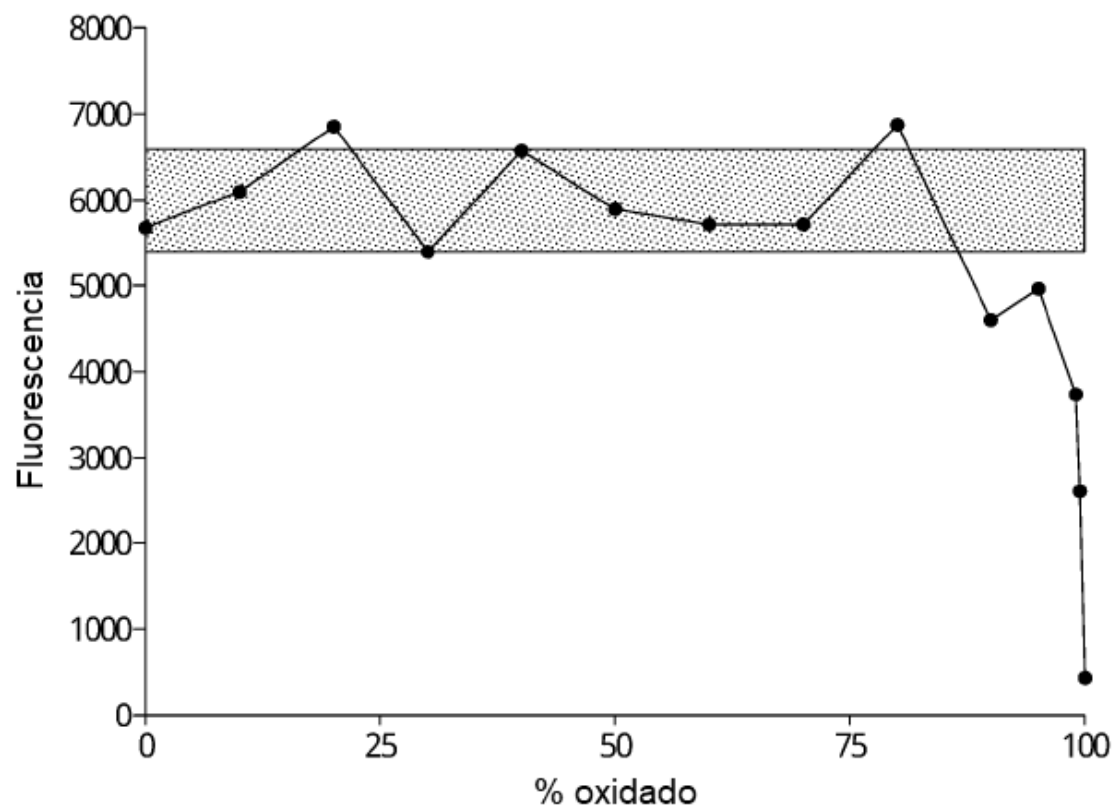


Fig. 3

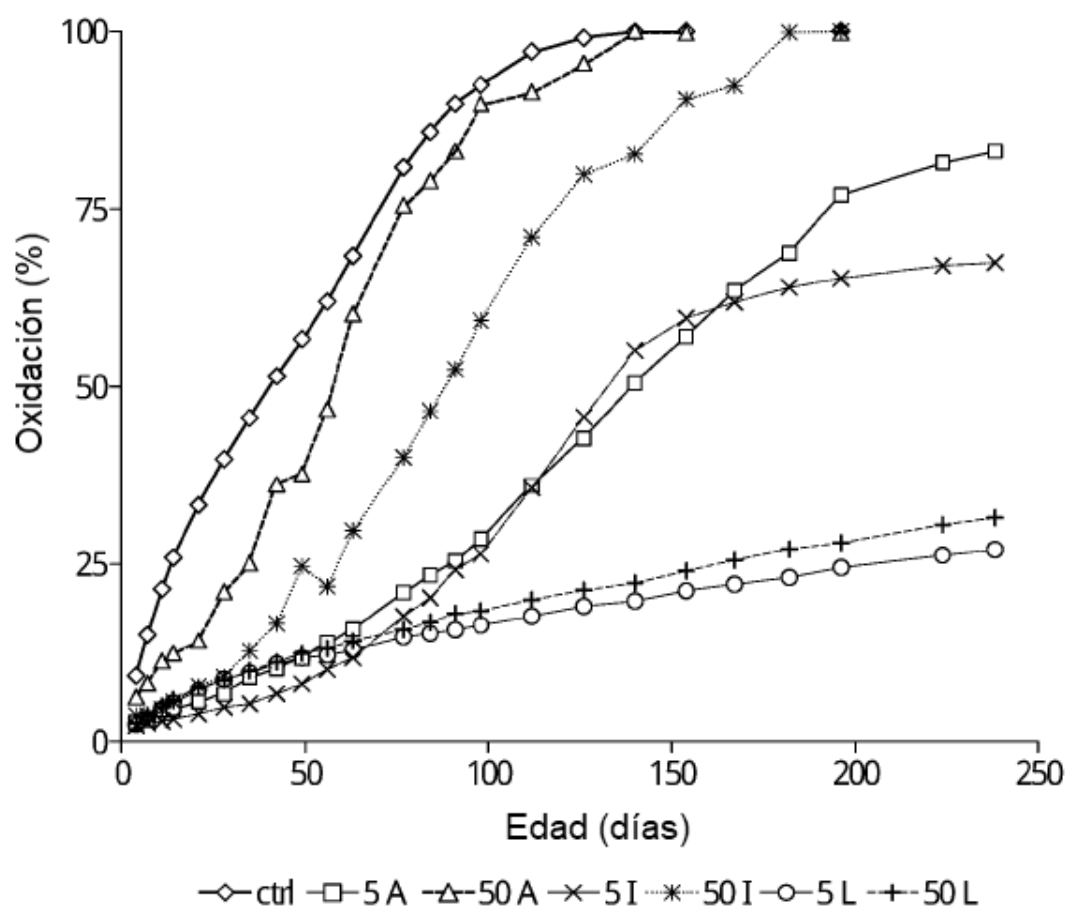


Fig. 4