



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 112019027770-6 A2



(22) Data do Depósito: 21/06/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 07/07/2020

(54) Título: DISPOSITIVO PARA INVESTIGAR UM ANALITO DE ÁCIDO NUCLEICO E USO

(51) Int. Cl.: B01L 3/00; C12Q 1/6869.

(30) Prioridade Unionista: 07/07/2017 EP 17180391.9; 21/06/2017 EP 17177204.9.

(71) Depositante(es): BASE4 INNOVATION LIMITED.

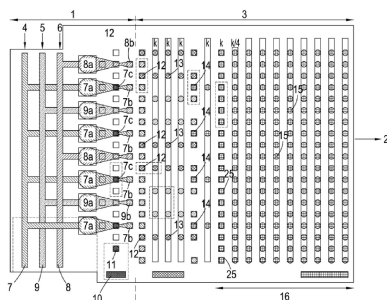
(72) Inventor(es): THOMAS HENRY ISAAC; PEDRO CUNHA; EOIN SHERIDAN; DAVID LOVE; REBECCA PALMER; DOUGLAS J. KELLY; GARETH PODD.

(86) Pedido PCT: PCT EP2018066574 de 21/06/2018

(87) Publicação PCT: WO 2018/234446 de 27/12/2018

(85) Data da Fase Nacional: 23/12/2019

(57) Resumo: Um dispositivo para investigar um analito de ácido nucleico caracterizado por compreender: ? uma primeira zona compreendendo um local de ligação ao qual o analito está ligado; um primeiro caminho para fazer com que um primeiro meio fluido flua sobre o local de ligação, permitindo assim que o ácido nucleico seja progressivamente pirofosforolizado em seus trifosfatos de nucleosídeos constituintes; um segundo caminho para remover os trifosfatos de nucleosídeo do entorno do sítio de ligação e um meio para criar, no segundo caminho, um segundo meio constituído por microgotículas aquosas em um transportador imiscível em água; ? uma zona de manipulação de microgotículas para manipular as microgotículas usando eletromolhamento mediado opticamente composto por: ? uma primeira parede compósita composta por ? um primeiro substrato transparente; ? uma primeira camada condutora transparente no substrato com uma espessura na faixa de 70 a 250 nm; ? uma camada fotoativa ativada por radiação eletromagnética na faixa de comprimento de onda 400-1000nm na camada condutora, com espessura na faixa de 300-1000nm e ? uma primeira camada dielétrica na camada condutora com uma espessura na faixa de 120 a 160 nm; ? uma segunda parede compósita composta por ? um segundo substrato; ? uma segunda camada condutora transparente no substrato com uma espessura na faixa de 70 a 250 nm e ? opcionalmente (...).



DISPOSITIVO PARA INVESTIGAR UM ANALITO DE ÁCIDO NUCLEICO E USO**Campo**

[0001] Esta invenção refere-se a um dispositivo para investigar uma molécula de ácido nucleico; em particular, um dispositivo para sequenciar DNA ou RNA de origem natural ou sintética.

[0002] Em nossos pedidos anteriores WO2014/053853, WO2014/053854, WO2014/167323, WO2014/167324 e WO2014/111723, descrevemos um novo método de sequenciamento que envolve a digestão progressiva de um analito polinucleotídico para gerar um fluxo ordenado de nucleotídeos, de preferência um fluxo de trifosfatos de nucleosídeo único, cada um dos quais pode ser capturado um a um em microgotículas correspondentes em um fluxo de microgotículas. Em seguida, cada gotícula pode ser quimicamente e/ou enzimaticamente manipulada para revelar o nucleotídeo único particular. Em uma concretização, essas manipulações químicas e/ou enzimáticas compreendem um método que envolve o uso de um ou mais tipos de sonda de oligonucleotídeo de dois componentes, cada um dos quais é adaptado para poder capturar seletivamente um dos tipos de nucleotídeo único a partir do qual o analito é constituído. Tipicamente, em cada um desses tipos de sonda, um dos dois componentes oligonucleotídicos compreende fluoróforos característicos e, no estado não utilizado da sonda, a capacidade desses fluoróforos para fluorescência permanece extinta em virtude da presença de extintores localizados próximos ou por auto-extinção. Em uso, quando a sonda captura seu nucleotídeo único correspondente, torna-se suscetível a exonucleólise ou

endonucleólise subsequentes, liberando assim os fluoróforos dos extintores e/ou um do outro, permitindo que eles fluoresçam livremente. Por este meio, o nucleotídeo único original presente em cada gotícula pode ser inferido indiretamente por meios espectroscópicos.

[0003] Ao projetar dispositivos de sequenciamento, é necessário manipular muitos milhares de microgotículas, garantindo, por exemplo, que elas possam ser entregues de maneira confiável em locais onde possam ser mescladas com outras e/ou seus conteúdos analisados quanto à presença ou ausência de fluorescência.

[0004] Uma maneira possível de fazer isso é estabelecer caminhos em um substrato ao longo do qual as microgotículas podem ser impulsionadas por forças de eletromolhamento. Os dispositivos para manipular gotículas relativamente grandes desta maneira foram descritos anteriormente no estado da técnica; ver, por exemplo, US6565727, US20130233425 e US20150027889. Tipicamente, isto é conseguido fazendo com que as gotículas, por exemplo, na presença de um fluido de suporte imiscível, viajem de um canal microfluídico definido por duas paredes opostas de um cartucho ou tubulação. Embutidos nas paredes do cartucho ou tubulação estão os eletrodos cobertos com uma camada dielétrica, cada um dos quais está conectado a um circuito de polarização A/C capaz de ser ligado e desligado rapidamente em intervalos para modificar as características de eletromolhamento da camada. Isso dá origem a forças capilares direcionais localizadas que podem ser usadas para direcionar a gotícula ao longo de um determinado caminho.

[0005] Uma variante dessa abordagem, com base em eletromolhamento opticamente mediado, foi ensinada, por exemplo, nos documentos US20030224528, US20150298125 e US20160158748. Em particular, o primeiro desses três pedidos de patente divulga vários dispositivos microfluídicos que incluem uma cavidade microfluídica definida pelas primeira e segunda paredes e em que a primeira parede possui design compósito e é composta de camadas de substrato, fotocondutora e isolante (dielétrica). Entre as camadas fotocondutora e isolante está disposto um conjunto de células condutoras que são eletricamente isoladas umas das outras e acopladas à camada fotoativa e cujas funções são gerar locais discretos correspondentes para recebimento de gotículas na camada de isolamento. Nesses locais, as propriedades de tensão superficial das gotículas podem ser modificadas por meio de forças de eletromolhamento. As células condutoras podem então ser ligadas e desligadas pela luz que incide na camada fotocondutora. Essa abordagem tem a vantagem de que a comutação é muito mais fácil e rápida, embora sua utilidade ainda seja, em certa medida, limitada pelo arranjo dos eletrodos. Além disso, há uma limitação à velocidade com que as gotículas podem ser movidas e até que ponto o caminho real das gotículas pode ser variado.

[0006] Uma concretização de parede dupla dessa última abordagem foi divulgada na Universidade da Califórnia na tese de Berkeley UCB/EECS-2015-119 por Pei. Aqui, é descrita uma célula que permite a manipulação de gotículas relativamente grandes na faixa de tamanho de 100 a 500 μm usando eletromolhamento ótico através de uma superfície de Teflon AF depositada sobre uma camada dielétrica.

Um padrão de luz sobre silício amorfo eletricamente polarizado não padronizado é descrito na forma esquemática. No entanto, no esquema mostrado, a camada dielétrica é fina (100 nm) e disposta unicamente na parede que suporta a camada fotoativa.

[0007] Nós agora desenvolvemos um dispositivo investigativo de ácido nucleico que é capaz de manipular muitos milhares de microgotículas simultaneamente, em conformidade com os requisitos de um método de detecção confiável de nucleotídeo único. Ele tem a vantagem de ser facilmente reconfigurável pela aplicação de software, tornando-o muito versátil; por exemplo, permitindo que o usuário o adapte prontamente para precisão ótima, rendimento ou detecção de determinadas modificações epigenéticas. Assim, de acordo com a presente invenção, é fornecido um dispositivo para investigar um analito de ácido nucleico caracterizado por compreender:

- uma primeira zona compreendendo um local de ligação ao qual o analito está ligado; um primeiro caminho para fazer com que um primeiro meio fluido flua sobre o local de ligação, permitindo assim que o ácido nucleico seja progressivamente pirofosforolizado em seus trifosfatos de nucleosídeos constituintes; um segundo caminho para remover os trifosfatos de nucleosídeo do entorno do sítio de ligação e um meio para criar, no segundo caminho, um segundo meio constituído por microgotículas aquosas em um transportador imiscível em água;

- uma zona de manipulação de microgotículas para manipular as microgotículas usando eletromolhamento mediado opticamente composto por:
- uma primeira parede compósita composta por
 - um primeiro substrato transparente;
 - uma primeira camada condutora transparente no substrato com uma espessura na faixa de 70 a 250 nm;
 - uma camada fotoativa ativada por radiação eletromagnética na faixa de comprimento de onda 400-1000nm na camada condutora, com espessura na faixa de 300-1000nm e
 - uma primeira camada dielétrica na camada condutora com uma espessura na faixa de 120 a 160 nm;
- uma segunda parede compósita composta por
 - um segundo substrato;
 - uma segunda camada condutora transparente no substrato com uma espessura na faixa de 70 a 250 nm e
 - opcionalmente uma segunda camada dielétrica na camada condutora tendo uma espessura na faixa de 25 a 50 nm;
 - em que as superfícies expostas das primeira e segunda camadas dielétricas estão dispostas a menos de

10 μm de distância para definir um espaço microfluídico adaptado para conter microgotículas;

- uma fonte A/C para fornecer uma diferença de potencial entre as primeira e segunda paredes compósitas que conectam as primeira e segunda camadas condutoras;
- pelo menos uma fonte de primeira radiação eletromagnética com uma energia maior que o intervalo de banda da camada fotoexcitável adaptada para colidir com a camada fotoativa para induzir os primeiros locais efêmeros correspondentes de primeiro eletromolhamento na superfície da primeira camada dielétrica;
- meios para manipular os pontos de impacto da radiação eletromagnética na camada fotoativa de modo a variar a disposição dos locais efêmeros de eletromolhamento, criando assim pelo menos um primeiro caminho de eletromolhamento ao longo do qual as microgotículas podem ser movidas;
- uma zona de detecção disposta a jusante da zona de manipulação de microgotículas ou integral com a mesma e
- um sistema de detecção de fluorescência ou espalhamento Raman compreendendo uma fonte de segunda radiação eletromagnética adaptada para colidir com as microgotículas na zona de detecção e um detector para detectar fluorescência ou espalhamento Raman emitido dali.

[0008] O dispositivo da presente invenção é especialmente adequado para analisar os nucleotídeos constituintes de um analito

de ácido nucleico e em uma concretização é um dispositivo para sequenciar DNA ou RNA. Em aplicações onde o analito de ácido nucleico é DNA, que é, adequadamente, um polinucleotídeo de cadeia dupla e pode ter um comprimento de cadeia de nucleotídeos que pode, em princípio, ser ilimitado; por exemplo, até e incluindo os muitos milhões de pares de bases de nucleotídeos encontrados em um fragmento de um genoma. Numa concretização, o analito terá, portanto, pelo menos 50, de preferência pelo menos 150 pares de bases de nucleotídeos; adequadamente, será maior que 500, maior que 1000 e, em alguns casos, mais de 5000 pares de bases nucleotídicas. Numa concretização, o analito é DNA de origem natural (por exemplo, material genético derivado de uma planta, animal, bactéria ou um vírus) embora o método seja igualmente aplicável para o sequenciamento de DNA parcial ou totalmente sintético ou, de fato outro ácido nucleico feito total ou parcialmente de nucleotídeos constituídos por bases nucleotídicas que não são comumente encontradas na natureza; isto é, nucleotídeos que possuem bases nucleotídicas que não adenina, timina, guanina, citosina e uracila. Exemplos de tais nucleobases incluem 4-acetilcitidina, 5-(carboxi-hidroximetil)uridina, 2-O-metilcitidina, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilamino-metiluridina, di-hidrouridina, 2-O-metilpseudouridina, 2-O inosina, N6-isopentiladenosina, 1-metiladenosina, 1-metilpseudouridina, 1-metilguanossina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanossina, 2-metiladenosina, 2-metilguanossina, 3-metilcitidina, 5-metilcitidina, N6-metiladenosina, 7-metilguanossina, 5-metilaminometiluridina, 5-

Metoxiaminometil-2-tiouridina, 5-metoxiuridina, 5-metoxicarbonilmetil-2-tiouridina, 5-metoxicarbonilmetiluridina, 2-metiltio-N6-isopenteniladenosina, ácido uridina-5-oxiacético-éster metílico, ácido uridina-5 oxiacético, wibutoxosina, wbutosina, pseudouridina, queuosina, 2-tiocididina, 5-metil-2-tiouridina, 2-tiouridina, 4-tiouridina, 5-metiluridina, 2-O-metil-5-metiluridina e 2-O-metiluridina. Quando o analito for RNA, considerações semelhantes serão aplicadas.

[0009] Na primeira zona do dispositivo, o analito é progressivamente pirofosforizado, na direção de 3-5' para gerar um fluxo de trifosfatos de nucleosídeo único cuja ordem corresponde à da sequência do analito. A pirofosforólise é geralmente realizada a uma temperatura na gama de 20 a 90°C na presença de um meio de reação incluindo uma enzima, tal como uma polimerase. Adequadamente, é conduzida de modo que os trifosfatos de nucleosídeo único sejam continuamente removidos da região de pirofosforólise ao redor da partícula por um meio fluido em fluxo que é aquoso. Numa concretização, este meio é tamponado e também contém os outros componentes necessários para sustentar a reação de pirofosforólise (polimerase, ânion pirofosfato, cátion magnésio etc.). Em outra concretização, o meio contém adicionalmente um ou mais de (a) tipos de sonda especificados em nossos pedidos de patente anteriores (ou sondas com função equivalente); (b) os vários produtos químicos e enzimas necessárias para fazer com que a sonda se ligue e capture o trifosfato de nucleosídeo único em questão (por exemplo, polimerase e/ou ligase) e (3) uma enzima necessária para provocar a exonucleólise subsequente da sonda

utilizada. Em uma concretização, alguns ou todos esses componentes são introduzidos juntos ou em estágios no meio aquoso em fluxo ou nas microgotículas formadas a partir deles (conforme o caso) em outros pontos ou zonas. Por exemplo, a introdução subsequente de alguns ou todos estes componentes diretamente para as microgotículas pode ser conseguida por injeção utilizando um injetor ou por coalescência das microgotículas.

[0010] De preferência, o dispositivo é concebido para ser operável de modo que a pirofosforólise é tão rápida quanto possível e em uma concretização esta taxa permanece na gama de 1 a 50 trifosfatos de nucleosídeo único por segundo. Mais informações sobre a reação de pirofosforólise como aplicada à degradação progressiva de polinucleotídeos podem ser encontradas, por exemplo, em J. Biol. Chem. 244 (1969) pp. 3019-3028.

[0011] A primeira zona do dispositivo é, em parte, caracterizada pela inclusão de um sítio de ligação que está adaptado para se ligar ao analito. Numa concretização, este local é adaptado para se ligar temporariamente a uma partícula com duas regiões de superfície diferentes. Adequadamente, compreende uma superfície localizada dentro da primeira zona que é modificada para ser removível de forma removível a uma partícula correspondente que contém uma molécula do analito; por exemplo, através de um revestimento metálico modificado quimicamente. Numa concretização, esta partícula compreende um grânulo; por exemplo, um microgrânulo, feito de um material inerte, como vidro, sílica, alumina, um metal ou um polímero não degradável. Em outra concretização, a partícula

tem um núcleo de material paramagnético, permitindo que ela seja manipulada magneticamente.

[0012] As duas regiões diferentes da superfície da partícula são adaptadas para se ligarem a locais complementares no sítio de ligação e no analito, respectivamente. Numa concretização, a primeira dessas regiões é composta por um revestimento metálico modificado quimicamente; por exemplo, um revestimento funcionalizado de ouro, prata, cobre ou outro metal. Noutra concretização, a segunda dessas regiões é composta por um ou mais locais reativos na partícula especificamente adaptada para se ligar física ou quimicamente a uma molécula do analito.

[0013] Existem muitas maneiras pelas quais os locais reativos na partícula e o local de ligação podem ser criados. Por exemplo, no caso da primeira região da partícula, ela pode ser preparada primeiramente revestindo parcialmente as partículas com metal usando um método conhecido como deposição de vapor de metal, deposição de camada atômica, deposição de plasma ou similares. Depois disso, a superfície do metal pode ser quimicamente modificada para introduzir uma ou mais primeiras porções que podem se ligar reversivelmente às segundas porções complementares no local de ligação. Numa concretização, esses pares de primeira e segunda porções são escolhidos de modo que a ligação criada entre eles possa ser reversível e rompida à temperatura ambiente ou próximo à temperatura ambiente. Por este meio, o grânulo pode ser fixado ao local de fixação, o analito digerido por pirofosforólise e depois o grânulo destacado do substrato, permitindo que este

receba outro grânulo fresco. Numa concretização, esses pares de primeira e segunda porções podem levar à formação de complexos de proteínas estáveis sob as condições de pirofosforólise, por exemplo, usando porções de avidina ou estreptavidina com porções de biotina complementares. Em outra, esses pares podem criar uma ligação química instável; como, por exemplo, em um par de polistididina/íons metálicos quelatados (ligação quebrada a pH baixo ou na presença de imidazol ou quelante de metal forte); um par de ácido borônico/carboidrato adequado (ligação quebrada em pH baixo) ou um par maleimido/selenol (ligação quebrada usando ácido meta-cloroperoxibenzóico). Nestes casos, a partícula pode ser subsequentemente destacada modificando o pH ou a composição do meio aquoso que flui através da primeira zona. Assim, em uma concretização do dispositivo, a primeira zona inclui ainda meios para introduzir e remover a partícula da primeira zona ou meios para introduzir e remover um meio de descolamento de partículas, como explicado mais adiante abaixo. Em outra, após o descolamento, a partícula é removida do local de fixação suspenso em sua própria microgotícula, que passa pelo restante do dispositivo. Se esta abordagem for empregada, em uma concretização a partícula incluirá seu próprio marcador característico de fluorescência ou dispersão Raman, permitindo ao usuário detectar quando a pirofosforólise está completa.

[0014] Numa concretização preferida, o par de porções mencionadas acima compreende uma porção de polistididina composta por uma pluralidade de resíduos de histidina (preferencialmente maiores que seis) e uma porção quelante selecionada a partir de,

por exemplo, um derivado de sal de nitrotriacetato (NTA) ou iminodiacetato (IDA) de um metal de transição como cobalto, cobre ou níquel. Deve ser observado que estas primeira e segunda porções podem ser implantadas no local da partícula e de ligação, respectivamente, de qualquer maneira.

[0015] Da mesma forma, no caso da segunda região da partícula, existem muitas maneiras pelas quais os locais reativos a analitos podem ser criados. Assim, em uma concretização, uma superfície não revestida da partícula pode ser preparada com um agente funcionalizante, por exemplo, no caso de uma sílica, alumina ou grânulos de vidro, um epoxissilano, um aminohidrocarbilsilano ou um mercaptossilano, para criar locais quimicamente reativos para os quais o analito pode ser ligado. Após isso, estes locais reativos podem ser tratados com um derivado do analito que foi correspondentemente modificado para incluir um terminal de grupo iniciador-reativo; por exemplo, em uma concretização, um grupo amina, succinil ou tiol. Em outra concretização, a ligação química pode ocorrer por meio de ligação a oligonucleotídeos adaptadores ou através do tipo de complexos de proteína descritos acima.

[0016] Em ainda outra concretização, a partícula assim iniciada compreenderá uma segunda região com apenas um local reativo ao analito, de modo que apenas uma molécula do analito possa ser atacada. Isso pode ser importante se o analito for um pequeno fragmento de polinucleotídeo, pois outras moléculas múltiplas tendem a se ligar durante a preparação, o que é indesejável. É uma preocupação menor se o fragmento de polinucleotídeo for grande,

pois os efeitos estéricos trabalharão para militar contra esse resultado. Adequadamente, a partícula terá um diâmetro máximo na faixa de 0,5 a 5 microns (μm).

[0017] Numa concretização preferida, as partículas são grânulos esféricos e a primeira e a segunda regiões compreendem regiões hemisféricas adjacentes uma à outra na superfície. Nesta concretização, a partícula é adequadamente um grânulo com um núcleo magnético; por exemplo, aqueles vendidos com o nome Dynabeads®.

[0018] No caso de uma concretização em que o grânulo tem um núcleo magnético, ele pode ser anexado e destacado do local de degradação usando um campo magnético induzido a partir de um eletroímã de um ímã permanente colocado na proximidade do dispositivo de sequenciamento.

[0019] A primeira zona é adequadamente uma câmara de dimensões microfluídicas contendo uma estrutura incluindo o local de fixação ou, em outra concretização, compreende um tubo microfluídico cuja superfície interna foi em parte revestida com o local de fixação. Em uma concretização, o local de fixação pode ainda incluir um assentamento no qual a partícula pode ser bem ajustada. Em outra concretização, a partícula pode ser mantida no lugar no local desejado por ligação à superfície ou magneticamente. Em ainda outra concretização, as partículas podem ter, por exemplo, um núcleo ou superfície ferromagnética, permitindo que sejam guiadas para o local de fixação pela aplicação de um eletroímã em estreita proximidade com ele. Em ainda outra concretização, a partícula é localizada e removida do sítio de ligação através da aplicação de

forças capilares a ela usando eletromolhamento convencional ou opticamente mediado em técnicas de dispositivo (EWOD). Assim, em uma concretização, a primeira zona inclui ainda eletrodos revestidos dielétricos ou elementos fotoativos (que podem ser permanentes ou efêmeros) na câmara ou tubulação que podem ser ativados para este propósito, conforme necessário.

[0020] Em uma concretização, o dispositivo inclui ainda uma zona de preparação localizada a montante da primeira zona na qual o grânulo é preparado e meios para mover o grânulo da zona de preparação para o local de fixação por meio de um segundo caminho de eletromolhamento.

[0021] Após a pirofosforólise, um segundo meio fluido em fluxo, por exemplo, um segundo meio aquoso, que contém os trifosfatos de nucleosídeo único separados espacialmente e temporalmente uns com os outros e dispostos em uma ordem correspondente ao da sequência de nucleotídeos do analito é removido em torno do local de ligação. Em uma concretização, a degradação pirofosforolítica ocorre em uma corrente contínua do primeiro meio fluido que é subsequentemente feito em gotas, causando o encapsulamento da molécula de trifosfato de nucleosídeo que anteriormente estava no segundo meio fluido.

[0022] Em outra concretização, a degradação pirofosforolítica ocorre de uma maneira transiente em um primeiro meio fluido goticulado no qual as microgotículas suspensas em um transportador imiscível temporariamente molham e desmolham o grânulo alvo à medida que elas são conduzidas sobre a sua superfície. Assim, se uma molécula de trifosfato de nucleosídeo for liberada da fita de

DNA quando a gotícula estiver em contato com o grânulo, ela será imediatamente encapsulada e removida a jusante no segundo meio fluido quando a microgotícula desmolhar do grânulo.

[0023] Deve ser observado que esta metodologia de microgotículas molhante/desmolhante terá aplicação além do sequenciamento se a transformação química progressiva realizada na analito for outra que não a pirofosforólise. Assim, de acordo com um segundo aspecto da presente invenção é proporcionado um método geral para realizar uma transformação química de uma molécula alvo immobilizada em um determinado local caracterizado pelas etapas de (a) gerar uma corrente de microgotículas, cada uma composta de um meio capaz de causar a transformação química; (b) por em contato com cada microgotícula por vez com a molécula alvo no local indicado e por um determinado período de tempo em condições em que a transformação química possa ocorrer; e (c) no final do período determinado, remover a microgotícula do local determinado. Numa concretização, a transformação química é a pirofosforólise do tipo descrito acima e um terceiro aspecto compreende um método para a realização de pirofosforólise de um polinucleotídeo alvo immobilizado em um determinado local caracterizado pelas etapas de (a) gerar uma corrente de microgotículas aquosas, cada uma constituída por um meio de pirofosforolizante; (b) por em contato cada microgotícula por vez com o polinucleotídeo alvo no local determinado e por um período de tempo determinado sob condições em que a pirofosforólise possa ocorrer e (c) no final do período determinado, remover a microgotícula do local determinado. Nesta concretização, pelo menos algumas das microgotículas removidas na etapa (c) conterão um único

trifosfato de nucleosídeo derivado do polinucleotídeo alvo que é imobilizado no local determinado por qualquer um dos meios descritos acima. Em outra, as microgotículas removidas corresponderão a uma corrente ordenada de trifosfatos de nucleosídeo correspondente à sequência nucleotídica do alvo. Adequadamente, as microgotículas são suspensas em um veículo imiscível do tipo descrito aqui.

[0024] Em ainda outra concretização, o segundo meio fluido é aquoso e entregue para uma segunda zona onde ele é, então, convertido em um fluxo correspondente de microgotículas aquosas; pelo menos algumas das quais contêm uma única molécula de trifosfato de nucleosídeo. Em uma concretização, isso é conseguido fazendo com que o segundo meio aquoso saia de uma cabeça geradora de gotículas de microgotículas de dimensões e geometria adequadas para um meio transportador que flui compreendendo um líquido imiscível, como um hidrocarboneto, fluorocarboneto ou óleo de silicone.

[0025] Para evitar o risco de que uma determinada microgotícula contenha mais de uma molécula de trifosfato de nucleosídeo único, é preferível liberá-las na etapa de pirofosforólise e/ou ajustar o fluxo de fluido através da primeira zona para que cada microgotícula gerada seja separada em média, de 1 a 20, de preferência 2 a 10 vazias. Adequadamente, as microgotículas tem um volume finito de menos do que 500pL (picolitros), de preferência inferior a 65pL, mais preferivelmente menos do que 4pl e ainda mais preferivelmente menos do que 2 pl. Mais preferidos de todos os seus

volumes estão na faixa de 4fL (femtolitros) a 4pL. Numa concretização, a vazão de microgotículas através do dispositivo está na faixa de 50 a 3000 microgotículas por segundo, de preferência 100 a 2000.

[0026] Depois disso, a corrente de microgotículas pode ser manipulada microfluidicamente e entregue à zona de manipulação de microgotículas.

[0027] No que diz respeito à zona de manipulação de microgotículas, esta é adequadamente uma estrutura construída ou definida pelas primeira e segunda paredes compósitas compostas de primeiro e segundo substratos, primeira e segunda camadas condutoras, uma camada fotoativa e primeira e segunda camadas dielétricas. Numa concretização, esta zona compreende um chip ou cartucho plano que é oco e acomoda o espaço microfluídico. Em outra, pelo menos as primeiras camadas do substrato e primeiras camadas condutoras são transparentes permitindo que a luz da fonte de radiação eletromagnética (por exemplo, laser de feixes múltiplos, ou díodos LED) incida diretamente sobre a camada fotoativa. Em outra, o segundo substrato, a segunda camada condutora e a segunda camada dielétrica são transparentes, de modo que o mesmo objetivo pode ser obtido. Em ainda outra concretização, todas essas camadas são transparentes, permitindo a iluminação de ambos os lados.

[0028] Adequadamente, os primeiro e segundo substratos são feitos de um material que é mecanicamente forte, por exemplo, vidro, metal ou plástico de engenharia. Numa concretização, os

substratos podem ter um grau de flexibilidade. Em ainda outra concretização, o primeiro e o segundo substratos têm uma espessura na faixa de 100-1000 μm .

[0029] As primeira e segunda camadas condutoras estão localizadas em uma superfície dos primeiro e segundo substratos e são tipicamente muito finas; cada uma com uma espessura na faixa de 70 a 250 nm, de preferência 70 a 150 nm. Em uma concretização, pelo menos uma dessas camadas é feita de um material condutor transparente, como óxido de índio-estanho (ITO), uma película muito fina de metal condutor, como prata, ou um polímero condutor, como PEDOT ou similar. As camadas podem ser formadas como uma folha contínua ou uma série de estruturas discretas tais como fios. Alternativamente, a camada condutora pode ser uma malha de material condutor com a radiação eletromagnética sendo direcionada entre os interstícios da malha.

[0030] A camada fotoativa é adequadamente composta de um material semicondutor que pode gerar áreas de carga localizadas em resposta à estimulação pela fonte de radiação eletromagnética. Os exemplos incluem o silício amorfo em uma faixa de espessura de 300 a 1000 nm. Em uma concretização, a camada fotoativa é ativada pela aplicação de luz visível.

[0031] A camada fotoativa no caso da primeira parede e opcionalmente a camada condutora no caso da segunda parede são revestidas com uma camada dielétrica que é muito fina e tipicamente na faixa de 120 a 160 nm. As propriedades dielétricas dessa camada incluem, de preferência, uma alta resistância dielétrica de $>10^7$

V/m e uma constante dielétrica de > 3 . Numa concretização, a camada dielétrica é selecionada a partir de alumina ou sílica de alta pureza, hafnia ou filme fino de polímero não condutor.

[0032] Em outra versão do dispositivo, pelo menos a primeira camada dielétrica, de preferência ambas, é revestida com uma camada anti-incrustante para auxiliar no estabelecimento do ângulo de contato desejado de microgotículas/óleo/superfície nos vários locais de eletromolhamento e adicionalmente para impedir que o conteúdo das microgotículas adiram à superfície e diminuam à medida que a gotícula é movida pelo dispositivo. Se a segunda parede não compreender uma segunda camada dielétrica, a segunda camada anti-incrustante pode ser aplicada diretamente sobre a segunda camada condutora. Para um desempenho ótimo, a camada anti-incrustação deve ajudar a estabelecer um ângulo de contato na gama de $50-70^\circ$, quando medido como uma interface de três pontos de superfície ar-líquido a 25°C . Dependendo da escolha da fase transportadora, o mesmo ângulo de contato das microgotículas em um dispositivo preenchido com uma emulsão aquosa será maior; maior que 100° . Numa concretização, essas camadas têm uma espessura inferior a 50 nm e são tipicamente uma camada monomolecular. Em outra, estas camadas são constituídas por um polímero de um éster de acrilato, tal como metacrilato de metila ou um derivado seu substituído por grupos hidrofílicos; por exemplo, alcoxissilil. De preferência, uma ou ambas as camadas anti-incrustantes são hidrofóbicas para garantir um desempenho ótimo.

[0033] As primeira e segunda camadas dielétricas e, portanto, as primeira e segunda paredes definem um espaço microfluídico com menos de 10 μm de profundidade e no qual as microgotículas estão contidas. Numa concretização, antes de estarem contidas no espaço das microgotículas, as microgotículas têm um diâmetro intrínseco que é mais de 10% maior, adequadamente mais de 20% maior, do que a profundidade do espaço das microgotículas. Isto pode ser conseguido, por exemplo, fornecendo ao dispositivo uma entrada a montante, tal como um orifício microfluídico, no qual são geradas microgotículas com o diâmetro desejado no meio transportador. Por este meio, ao entrar no dispositivo, as microgotículas são submetidas à compressão, levando a um desempenho aprimorado de eletromolhamento para certas operações através da adição de energia potencial de superfície acima da condição esférica não comprimida das microgotículas.

[0034] Em outra concretização, o espaço microfluídico inclui um ou mais espaçadores para manter as primeira e segunda paredes separadas a uma profundidade predeterminada. As opções para espaçadores incluem grânulos ou pilares, sulcos ou similares criados a partir de uma camada de resistência intermediária que foi produzida por foto-padronização. Várias geometrias espaçadoras também podem ser usadas para definir canais estreitos, canais cônicos ou canais parcialmente fechados que são definidos por linhas de pilares. Pelo design cuidadoso, é possível utilizar estas estruturas para auxílio na deformação das microgotículas, para subseqüentemente efetuar a divisão das gotículas e para efetuar operações sobre as microgotículas deformadas.

[0035] A profundidade entre as primeira e segunda paredes afeta o nível de deformação das microgotículas; adicionando ou removendo o arrasto da superfície que impede o movimento de microgotículas. Ao estruturar o dispositivo de modo que o espaçamento entre as primeira e segunda paredes varie pelo dispositivo, é possível ter um dispositivo composto no qual o perfil de desempenho preferido esteja disponível para diferentes operações; por exemplo, uma tal região pode ter profundidade de menos que 2 μ m em regiões onde microgotículas de 5 μ m de diâmetro devem ser deformadas para a separação, e uma região vizinha pode ter um espaçamento de cerca de 5 μ m na qual microgotículas do mesmo tamanho experimentam menos arrasto de superfície e, portanto, são capazes de se mover em velocidades mais altas.

[0036] As primeira e segunda paredes são polarizadas usando uma fonte de energia A/C conectada às camadas condutoras para fornecer uma diferença de potencial de tensão entre elas; adequadamente na faixa de 10 a 50 volts.

[0037] O dispositivo de sequenciamento da presente invenção inclui ainda uma fonte de radiação eletromagnética com um comprimento de onda na faixa de 400 a 1000 nm e uma energia maior que o intervalo de banda da camada fotoexcitável. Adequadamente, a camada fotoativa será ativada em locais de eletromolhamento, onde a intensidade incidente da radiação empregada está na faixa de 0,01 a 0,2 Wcm⁻². A fonte de radiação eletromagnética é, numa concretização, altamente atenuada e, em outra, pixelada, de modo a produzir regiões fotoexcitadas correspondentes sobre a camada

fotoativa que também são pixeladas. Por este meio, os locais correspondentes de eletromolhamento pixelados na primeira camada dielétrica são induzidos. Em contraste com o design ensinado em US20030224528, estes pontos de eletromolhamento pixelados não estão associados com qualquer estrutura permanente correspondente na primeira parede à medida que as células condutoras estão ausentes. Como consequência, no dispositivo da presente invenção e na ausência de qualquer iluminação, todos os pontos na superfície da primeira camada dielétrica têm uma propensão igual de se tornarem locais de eletromolhamento. Isso torna o dispositivo muito flexível e os caminhos de eletromolhamento altamente programáveis. Para distinguir essa característica dos tipos de estrutura permanente ensinados no estado da técnica, optamos por caracterizar os locais de eletromolhamento gerados em nosso dispositivo como 'efêmeros' e as reivindicações de nosso pedido devem ser interpretadas de acordo.

[0038] O projeto de estrutura otimizado ensinado aqui é particularmente vantajoso, pois a pilha compósita resultante possui as propriedades de anti-incrustação e de modificação do ângulo de contato da monocamada revestida (ou camada funcionalizada muito fina) combinadas com o desempenho de uma camada intermediária mais espessa com alta força dielétrica e alta constante dielétrica (como óxido de alumínio ou hafnia). A estrutura resultante da camada é altamente adequada para a manipulação de microgotículas de volume muito pequeno, como aquelas com diâmetro menor que 10 μm , por exemplo, na faixa de 2 a 8, 2 a 6, 2 a 5 ou 2 a 4 μm . Para essas microgotículas extremamente pequenas, a vantagem de desempenho de

ter uma espessura mínima da pilha não condutora total acima da camada fotoativa é extremamente vantajosa, pois as dimensões da gotícula começam a se aproximar da espessura da pilha dielétrica e, portanto, o gradiente de campo através da gotícula (um requisito para movimento induzido por eletromolhamento) é reduzido para o dielétrico mais espesso.

[0039] Onde a fonte de radiação eletromagnética é pixelada, ela é adequadamente fornecida direta ou indiretamente usando uma tela reflexiva iluminada pela luz de LEDs. Isso permite que padrões altamente complexos de locais efêmeros de eletromolhamento sejam rapidamente criados e destruídos na primeira camada dielétrica, permitindo assim que as microgotículas sejam guiadas com precisão ao longo dos caminhos de eletromolhamento usando forças de eletromolhamento bem controladas. Isso é especialmente vantajoso quando o objetivo é manipular muitos milhares de microgotículas simultaneamente ao longo de vários caminhos de eletromolhamento. Tais caminhos de eletromolhamento podem ser vistos como sendo construídos a partir de um contínuo de locais virtuais de eletromolhamento na primeira camada dielétrica.

[0040] Os pontos de impacto das fontes de radiação eletromagnética na camada fotoativa podem ter qualquer forma conveniente, incluindo a circular convencional. Numa concretização, as morfologias destes pontos são determinadas pelas morfologias das correspondentes pixelações e em outra correspondem total ou parcialmente às morfologias das microgotículas depois de terem entrado no espaço microfluídico. Em uma concretização

preferida, os pontos de impacto e, portanto, os locais de eletromolhamento podem ser em forma crescente e orientados na direção pretendida de deslocamento da microgotícula. Em outra concretização, a segunda parede também inclui uma camada fotoativa que permite que outros locais efêmeros de eletromolhamento sejam induzidos na segunda camada dielétrica; seja por meio da mesma fonte de radiação eletromagnética ou de uma segunda fonte do tipo aqui descrito. Adequadamente, os próprios locais de eletromolhamento são menores do que a superfície da microgotícula aderente à primeira parede e dão um gradiente de intensidade de campo máxima em toda a linha de contato formada entre a gotícula e a superfície dielétrica. A adição de uma segunda camada fotoativa permite a possibilidade de fazer a transição da aresta de molhamento a partir da superfície superior para a inferior da zona de manipulação de microgotículas, e a aplicação direcionada de forças de eletromolhamento alternativas ou adicionais para cada microgotícula.

[0041] Em uma concretização, os meios para manipular os pontos de impacto da radiação eletromagnética na camada fotoativa são adaptados ou programados para produzir uma pluralidade de primeiros caminhos de eletromolhamento em funcionamento concomitante, por exemplo, paralelos, na primeira e, opcionalmente, na segunda camada dielétrica. Em outra concretização, são adaptados ou programados para, assim, produzir uma pluralidade de terceiros caminhos de eletromolhamento nas primeiras e, opcionalmente, nas segundas camadas dielétricas que interceptam com os primeiros caminhos de eletromolhamento para criar pelo menos um local de coalescência de

microgotículas onde diferentes microgotículas que viajam ao longo de caminhos diferentes podem ser feitas coalescerem. O primeiro e o terceiro caminho de eletromolhamento podem se cruzar perpendicularmente um ao outro ou a qualquer ângulo, inclusive de frente. Esta concretização é especialmente útil quando se deseja entregar componentes adicionais, por exemplo, os componentes de um sistema de captura de trifosfato de nucleosídeo e/ou várias enzimas e outros componentes químicos, nas microgotículas na zona de manipulação de microgotícula. Numa concretização preferida, o sistema de captura é baseado em sondas de fluorescência que seu estado não usado é não-fluorescente. Exemplos de sistemas adequados incluem aqueles de nossos pedidos de patente ensinados acima e além de nossos pedidos de patente não publicados EP16187112.4, EP16187493.8 e EP16189791.3, embora essa lista não deva ser interpretada como limitativa. Em ainda outra concretização em que vários primeiro, segundo e terceiro caminhos de molhamento são empregados, os meios para manipular os pontos de impacto são adequadamente controlados por um microprocessador que não apenas cria os caminhos pelos quais as microgotículas passam, mas também sincroniza o movimento de cada microgotícula em relação uma a outra.

[0042] O sequenciador da presente invenção compreende ainda uma zona de detecção que pode ser parte integrante da zona de manipulação de microgotículas (por exemplo, dentro do chip) ou localizada separadamente a jusante da mesma e um sistema de fluorescência ou dispersão de Raman associado, adaptado para colidir com as microgotículas. Numa preferida concretização, a

detecção de fluorescência a partir de fluoróforos derivados que são liberados por digestão exonucleolítica ou clivagem endonucleolítica é empregada. Em uma concretização, a zona de detecção pode compreender uma superfície provida de locais para os quais as microgotículas são conduzidas por um ou uma combinação de EWOD convencional ou opticamente mediado. Essa superfície pode ser perfilada com estruturas tais como poços e similares para criar destinos finais para as microgotículas. Nesta concretização, o sistema de detecção de fluorescência é configurado de modo que a segunda radiação eletromagnética é feita colidir sobre estes destinos finais para estimular as emissões de fluorescência a partir da microgotícula que é detectada por um fotodetector ou semelhantes. Em outra concretização, a zona de detecção compreende um bloco de tubos capilares através do qual cada microgotícula é empilhada e viaja antes de ser interrogada pelo sistema de detecção de fluorescência no ponto de saída.

[0043] No que diz respeito ao sistema de detecção de fluorescência, este é composto por uma ou mais fontes de segunda radiação eletromagnética, por exemplo, um de mais lasers ou LEDs para interrogar o conteúdo de cada microgotículas e um ou mais fotodetectores ou um dispositivo equivalente sintonizado para o(s) comprimento(s) de onda de fluorescência característico(s) ou envelope(s) de comprimento de onda dos vários fluoróforos empregados no sistema de captura particular que está sendo usado. Qualquer fluorescência detectada pelo(s) fotodetector(es) a partir de então gera um sinal elétrico que pode ser processado e analisado

em um computador usando algoritmos conhecidos para revelar dados característicos da sequência do analito.

[0044] Numa concretização, o dispositivo da presente invenção inclui ainda um microprocessador central e programas/algoritmos de computador associados para controlar e automatizar algumas ou todas as suas várias operações.

[0045] Será evidente que o dispositivo da presente invenção pode ser utilizado em associação com um método de sequenciamento correspondente. Assim, de acordo com um quarto aspecto da presente invenção, é fornecido um método para investigar um analito de polinucleotídeo caracterizado por compreender as etapas de:

- fazer com que um meio aquoso pirofosforolizante entre em contato com o analito imobilizado em um local de ligação localizado em um primeiro caminho; permitindo assim que o analito seja progressivamente pirofosforolizado nos seus trifosfatos de nucleosídeo constituintes;
- remover os trifosfatos de nucleosídeo de todo o local de ligação na forma de um segundo meio aquoso por um segundo caminho microfluídico;
- manipular microgotículas derivadas do segundo meio aquoso em um meio transportador imiscível usando um dispositivo de eletromolhamento mediado opticamente composto de
 - uma primeira parede compósita composta por
 - um primeiro substrato transparente;

- uma primeira camada condutora transparente no substrato com uma espessura na faixa de 70 a 250 nm;
 - uma camada fotoativa ativada por radiação eletromagnética na faixa de comprimento de onda 400-1000nm na camada condutora com uma espessura na faixa de 300-1000nm e
 - uma primeira camada dielétrica na camada condutora com uma espessura na faixa de 120 a 160 nm e
- uma segunda parede compósita composta por
- um segundo substrato;
 - uma segunda camada condutora transparente no substrato com uma espessura na faixa de 70 a 250 nm e
 - opcionalmente uma segunda camada dielétrica na camada condutora tendo uma espessura na faixa de 25 a 50 nm;
 - em que as superfícies expostas da primeira e da segunda camadas dielétricas estão dispostas a menos de 10 μm de distância para definir um espaço microfluídico adaptado para conter microgotículas;

- uma fonte A/C para fornecer uma diferença de potencial entre as primeira e segunda paredes compósitas que conectam as primeira e segunda camadas condutoras;
- pelo menos uma fonte de primeira radiação eletromagnética com uma energia maior que o intervalo de banda da camada fotoexcitável adaptada para colidir com a camada fotoativa para induzir os locais de primeiro eletromolhamento efêmeros correspondentes na superfície da primeira camada dielétrica e
- meios para manipular os pontos de impacto da radiação eletromagnética na camada fotoativa de modo a variar a disposição dos locais efêmeros de eletromolhamento, criando assim pelo menos um primeiro caminho de eletromolhamento ao longo do qual as microgotículas podem ser movidas;

em que as microgotículas em algum ponto durante a manipulação compreendem ainda parte ou todo um trifosfato de nucleosídeo, um sistema de captura de oligonucleotídeo composto por sondas de fluorescência que em seu estado não utilizado são não fluorescentes, uma polimerase, opcionalmente uma ligase e uma exonuclease e/ou uma endonuclease capaz de fazer com que o(s) fluoróforos(s) seja(m) liberado(s) do sistema de captura usado em um estado fluorescente;

- detectar fluorescência derivada do(s) fluoróforo(s) liberado(s) em cada microgotícula quando irradiado com uma fonte de radiação eletromagnética.

[0046] O analito pode ser DNA ou RNA de origem natural ou sintética e o sistema de captura escolhido será compatível com ele. O método é especialmente adequado para sequenciamento e em uma concretização pode ser utilizado vantajosamente com o terceiro aspecto da invenção descrito acima.

[0047] Um dispositivo de acordo com a presente invenção adequado para sequenciar o analito de DNA polinucleotídico é agora ilustrado pelas seguintes figuras e descrição.

[0048] A Figura 1 mostra um plano de um chip microfluídico compreendendo a zona 1 de preparação de microgotículas e a zona de manipulação de microgotículas 3 em conjunto em um único chip feito de plástico transparente. 1 compreende regiões contendo fluido 7, 8 e 9 ligadas a entradas 4, 5 e 6 que, respectivamente, introduzem no chip um fluxo pirofosforolizante, um fluxo de pirofosfatase inorgânica e um fluxo de vários químicos de detecção e enzimas necessárias para a identificação de trifosfatos de nucleosídeo de acordo com um de nossos pedidos de patentes anteriores. Estes fluxos são em seguida entregues, respectivamente, para os orifícios 7a, 8a e 9a a partir dos quais várias microgotículas 7b, 8b e 9b são produzidas (por exemplo, utilizando uma cabeça de distribuição de gotículas ou por corte a partir de uma gotícula intermediária maior). 10 é um reservatório contendo microgrânulos compósitos de polímero paramagnético 11 aos quais está ligada uma única molécula

do analito de polinucleotídeo a ser sequenciado. Cada um dos 11 é transportado ao longo do caminho de eletromolhamento 12 para um local 7c onde é mantido e contatado com um fluxo de 7b. No processo, o analito ligado a 11 é progressivamente pirofosforolizado a uma velocidade tal que, após cada 7b ser desengatado de 11, ele fica vazio ou contém apenas uma molécula de trifosfato de nucleosídeo. Depois do desengate, 7b, juntamente com microgotículas 8b e 9b, são feitos a mover para 3, onde eles são manipulados ao longo de vários caminhos de optoeletromolhamento (definidos aqui por locais quadrados de eletromolhamento 25) a uma temperatura de 30-40°C, em conformidade com o esquema ilustrado na Figura 2. No processo, 7b e 8b são primeiramente feitos coalescer em primeiros pontos de coalescência 12 para gerar microgotículas intermediárias 13 que são posteriormente feitas coalescer com 9b em segundos pontos de coalescência 14 para gerar uma pluralidade de fluxos de microgotículas finais 15 que se movem para a frente através uma região de incubação 16 por meio de optoeletromolhamento a uma temperatura na faixa de 60 a 75°C, a fim de permitir que os conteúdos incubem e as reações químicas e enzimáticas necessárias ocorram. Posteriormente, 15 são transportados para os locais finais na zona de detecção 2, onde são interrogados com luz de uma fonte de LED e qualquer fluorescência emitida por cada microgotícula é detectada usando um fotodetector. A saída do fotodetector é um fluxo de dados correspondente à sequência do analito que pode ser analisado usando algoritmos de sequenciamento conhecidos.

[0049] A Figura 2 mostra uma vista parcial, em corte, de 3 ilustrando a forma como as várias microgotículas são manipuladas.

3 compreende placas de plástico transparentes ou de vidro superior e inferior (17a e 17b) cada uma 500 µm de espessura e revestidas com camadas transparentes de condutor Óxido de Estanho de Índio (ITO) 18a e 18b com uma espessura de 130 nm. Cada uma de 18a e 18b está conectada a uma fonte A/C 19 com a camada ITO em 18b sendo o terra. 18b é revestida com uma camada de silício amorfo 20 com 800 nm de espessura. 18a e 20 são, cada uma, revestidas com uma camada de espessura 160nm de alumina de alta pureza ou hafnia 21a e 21b, que são por sua vez revestidas com uma monocamada de poli(3-(trimetoxissilil)propilmetacrilato) 22 para tornar suas superfícies hidrofóbicas. 21a e 21b estão espaçadas a 3µM utilizando espaçadores (não mostrados), de modo que as microgotículas sofrem um grau de compressão quando introduzidas no dispositivo. Uma imagem de uma tela pixelizada refletiva, iluminada por uma fonte de luz LED 23 é disposta geralmente abaixo de 17b e luz visível (comprimento de onda 660 ou 830nm) a um nível de 0,01Wcm² é emitida a partir de cada diodo 24 e causa impacto em 20 por propagação na direção das múltiplas setas ascendentes através de 17b e 18b. Nos vários pontos de impacto, regiões de carga fotoexcitadas 26 são criadas em 20, as quais induzem ângulos de contato líquido-sólido modificados em 21b nos locais correspondentes de eletromolhamento 25. Essas propriedades modificadas fornecem a força capilar necessária para impulsionar as microgotículas de um ponto 25 para outro. 23 é controlado por um microprocessador (não mostrado) que determina quais de 26 na matriz são iluminados a qualquer momento por algoritmos pré-programados. Dessa maneira, as várias microgotículas podem ser

movidas ao longo dos vários caminhos mostrados na Figura 1 de maneira sincronizada.

[0050] A Figura 3 mostra um plano de cima para baixo de uma microgotícula típica (aqui 7b) localizada em um local 25 em 21b com o contorno pontilhado 7' que delimita a extensão do toque. Neste exemplo, 26 possui forma crescente na direção de deslocamento de 7b.

REIVINDICAÇÕES

1. Dispositivo para investigar um analito de ácido nucleico **caracterizado pelo fato de que** compreende:

- uma primeira zona compreendendo um local de ligação ao qual o analito está ligado; um primeiro caminho para fazer com que um primeiro meio fluido flua sobre o local de ligação, permitindo assim que o ácido nucleico seja progressivamente pirofosforolizado em seus trifosfatos de nucleosídeos constituintes; um segundo caminho para remover os trifosfatos de nucleosídeo do entorno do sítio de ligação e um meio para criar, no segundo caminho, um segundo meio constituído por microgotículas aquosas em um transportador imiscível em água;
- uma zona de manipulação de microgotículas para manipular as microgotículas usando eletromolhamento mediado opticamente composto por:
 - o uma primeira parede compósita composta por:
 - um primeiro substrato transparente;
 - uma primeira camada condutora transparente no substrato com uma espessura na faixa de 70 a 250 nm;
 - uma camada fotoativa ativada por radiação eletromagnética na faixa de comprimento de onda 400-1000nm na camada condutora, com espessura na faixa de 300-1000nm e

- uma primeira camada dielétrica na camada condutora com uma espessura na faixa de 120 a 160 nm;
 - o uma segunda parede compósita composta por
 - um segundo substrato;
 - uma segunda camada condutora transparente no substrato com uma espessura na faixa de 70 a 250 nm e
 - uma segunda camada dielétrica na camada condutora tendo uma espessura na faixa de 120 a 160 nm;
- em que as superfícies expostas das primeira e segunda camadas dielétricas estão dispostas a menos de 10 μm de distância para definir um espaço microfluídico adaptado para conter microgotículas;
- uma fonte A/C para fornecer uma diferença de potencial entre as primeira e segunda paredes compósitas que conectam as primeira e segunda camadas condutoras;
 - pelo menos uma fonte de primeira radiação eletromagnética com uma energia maior que o intervalo de banda da camada fotoexcitável adaptada para colidir com a camada fotoativa para induzir os primeiros locais efêmeros correspondentes de primeiro eletromolhamento na superfície da primeira camada dielétrica;
 - meios para manipular os pontos de impacto da radiação eletromagnética na camada fotoativa de modo a variar a disposição dos locais efêmeros de eletromolhamento, criando assim pelo menos

um primeiro caminho de eletromolhamento ao longo do qual as microgotículas podem ser movidas;

- uma zona de detecção disposta a jusante da zona de manipulação de microgotículas ou integral com a mesma e
- um sistema de detecção de fluorescência ou espalhamento Raman compreendendo uma fonte de segunda radiação eletromagnética adaptada para colidir com as microgotículas na zona de detecção e um detector para detectar fluorescência ou espalhamento Raman emitido dali.

2. Dispositivo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo fato de que** a zona de detecção compreende uma série de locais de eletromolhamento.

3. Dispositivo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo fato de que** a zona de detecção compreende um bloco de tubos capilares através dos quais as microgotículas passam pelo(s) ponto(s) de impacto da segunda radiação eletromagnética, sendo a(s) saída(s) do(s) canal(is) microfluídico(s).

4. Dispositivo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo fato de que** o grânulo está immobilizado em uma região sobre a qual microgotículas discretas são direcionadas sequencialmente, de modo que cada gotícula molha o grânulo por um período de tempo após o qual ela molha ou desmolha parcialmente o grânulo.

5. Dispositivo, de acordo com a reivindicação 4 e 1 a 3, **caracterizado pelo fato de que** a degradação pirofosforolítica do

DNA no grânulo ocorre quando o grânulo está em contato temporário com a gotícula aquosa que é acionada sobre ele.

6. Dispositivo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, **caracterizado pelo fato de que** o local de ligação é adaptado para receber um grânulo ao qual o analito está ligado.

7. Dispositivo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, **caracterizado pelo fato de que** compreende ainda a montante da primeira zona uma zona de preparação para preparar o grânulo e em que o grânulo é movido da zona de preparação para a primeira zona por meio de um segundo caminho de eletromolhamento.

8. Dispositivo, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado pelo fato de que** o segundo caminho de eletromolhamento é composto por segundos locais de eletromolhamento correspondentes a eletrodos revestidos dielétricos e/ou camadas fotoativas revestidas dielétricas.

9. Dispositivo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, **caracterizado pelo fato de que** as primeira e segunda paredes compósitas compreendem ainda primeira e segunda camadas anti-incrustantes respectivamente nas primeira e segunda camadas dielétricas.

10. Dispositivo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, **caracterizado pelo fato de que** o espaço microfluídico é ainda definido por um espaçador ligado às primeira e segunda paredes compósitas.

11. Dispositivo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, **caracterizado pelo fato de que** o espaço microfluídico tem profundidade de 2 a 8 μm .

12. Dispositivo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, **caracterizado pelo fato de que** compreende ainda uma pluralidade de primeiros caminhos de eletromolhamento que correm concomitantemente entre si.

13. Dispositivo, de acordo com a reivindicação 12, **caracterizado pelo fato de que** compreende ainda uma pluralidade de terceiros caminhos de eletromolhamento adaptados para interceptar com os primeiros caminhos de eletromolhamento para criar pelo menos um local de coalescência de microgotículas.

14. Dispositivo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 13, **caracterizado pelo fato de que** uma série de canais de alimentação de fluido contínuo está em interface com a zona de manipulação de microgotículas e é usada para fornecer os reagentes de entrada que são subseqüentemente goticulados e manipulados.

15. Dispositivo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 14, **caracterizado pelo fato de que** os meios para manipular os pontos de impacto da radiação eletromagnética na camada fotoativa compreendem um microprocessador para criar alguns ou todos os primeiros, segundos e terceiros caminhos de eletromolhamento e sincronizar o movimento de cada microgotícula no(s) caminho(s) em relação a todos os outros.

16. Uso de um dispositivo, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 15, **caracterizado pelo fato de que** é para ser sequenciador de DNA ou RNA de origem natural ou sintética.

FIGURA 1

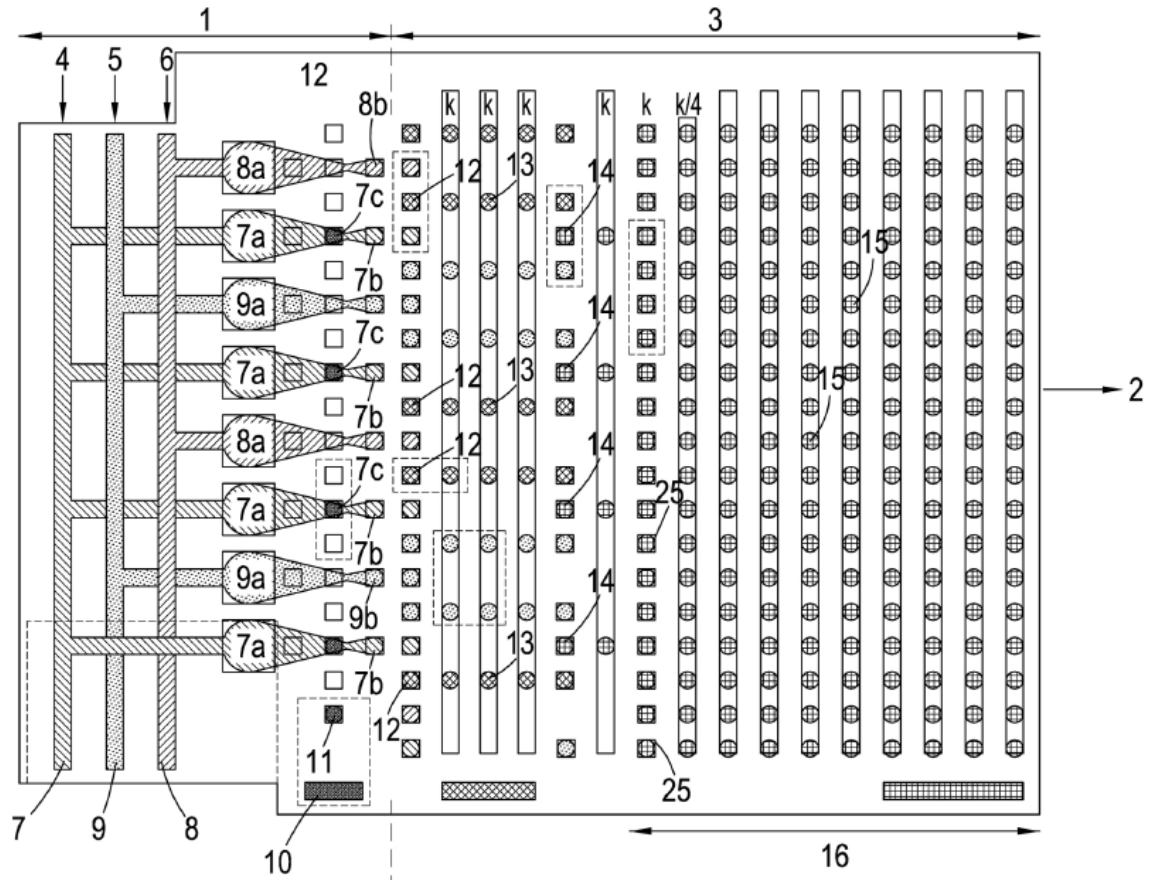


FIGURA 2

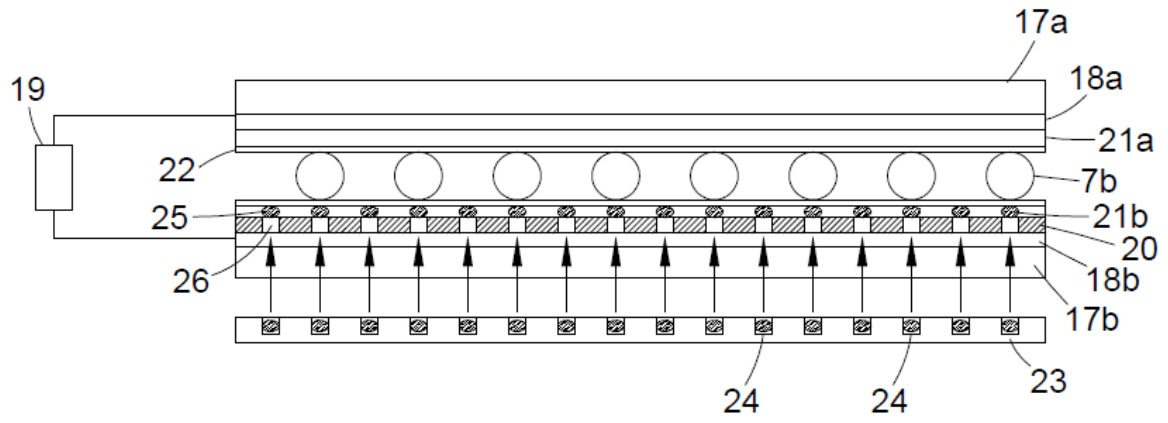
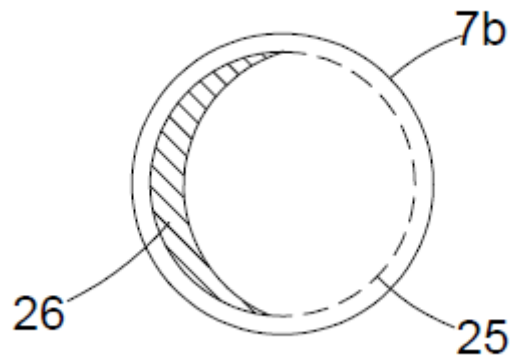


FIGURA 3



RESUMO**DISPOSITIVO PARA INVESTIGAR UM ANALITO DE ÁCIDO NUCLEICO E USO**

Um dispositivo para investigar um analito de ácido nucleico caracterizado por compreender:

- uma primeira zona compreendendo um local de ligação ao qual o analito está ligado; um primeiro caminho para fazer com que um primeiro meio fluido flua sobre o local de ligação, permitindo assim que o ácido nucleico seja progressivamente pirofosforolizado em seus trifosfatos de nucleosídeos constituintes; um segundo caminho para remover os trifosfatos de nucleosídeo do entorno do sítio de ligação e um meio para criar, no segundo caminho, um segundo meio constituído por microgotículas aquosas em um transportador imiscível em água;
- uma zona de manipulação de microgotículas para manipular as microgotículas usando eletromolhamento mediado opticamente composto por:
- uma primeira parede compósita composta por
 - um primeiro substrato transparente;
 - uma primeira camada condutora transparente no substrato com uma espessura na faixa de 70 a 250 nm;
 - uma camada fotoativa ativada por radiação eletromagnética na faixa de comprimento de onda 400-1000nm na camada condutora, com espessura na faixa de 300-1000nm e
 - uma primeira camada dielétrica na camada condutora com uma espessura na faixa de 120 a 160 nm;

- uma segunda parede compósita composta por
 - um segundo substrato;
 - uma segunda camada condutora transparente no substrato com uma espessura na faixa de 70 a 250 nm e
 - opcionalmente uma segunda camada dielétrica na camada condutora tendo uma espessura na faixa de 120 a 160 nm;
 - em que as superfícies expostas das primeira e segunda camadas dielétricas estão dispostas a menos de 10 μm de distância para definir um espaço microfluídico adaptado para conter microgotículas;
- uma fonte A/C para fornecer uma diferença de potencial entre as primeira e segunda paredes compósitas que conectam as primeira e segunda camadas condutoras;
- pelo menos uma fonte de primeira radiação eletromagnética com uma energia maior que o intervalo de banda da camada fotoexcitável adaptada para colidir com a camada fotoativa para induzir os primeiros locais efêmeros correspondentes de primeiro eletromolhamento na superfície da primeira camada dielétrica;
- meios para manipular os pontos de impacto da radiação eletromagnética na camada fotoativa de modo a variar a disposição dos locais efêmeros de eletromolhamento, criando assim pelo menos um primeiro caminho de eletromolhamento ao longo do qual as microgotículas podem ser movidas;
- uma zona de detecção disposta a jusante da zona de manipulação de microgotículas ou integral com a mesma e

- um sistema de detecção de fluorescência ou espalhamento Raman compreendendo uma fonte de segunda radiação eletromagnética adaptada para colidir com as microgotículas na zona de detecção e um detector para detectar fluorescência ou espalhamento Raman emitido dali.