

ITALIAN PATENT OFFICE

Document No.

102012902075381A1

Publication Date

20140203

Applicant

STMICROELECTRONICS S.R.L.

Title

DISPOSITIVO MICROFLUIDICO MONOUSO, CARTUCCIA INCLUDENTE IL
DISPOSITIVO MICROFLUIDICO, APPARECCHIO PER ESEGUIRE UNA
AMPLIFICAZIONE DI ACIDO NUCLEICO, METODO DI FABBRICAZIONE DEL
DISPOSITIVO MICROFLUIDICO, E METODO DI USO DEL DISPOSITIVO
MICROFLUIDICO

DESCRIZIONE

del brevetto per invenzione industriale dal titolo:

"DISPOSITIVO MICROFLUIDICO MONOUSO, CARTUCCIA INCLUDENTE IL DISPOSITIVO MICROFLUIDICO, APPARECCHIO PER ESEGUIRE UNA AMPLIFICAZIONE DI ACIDO NUCLEICO, METODO DI FABBRICAZIONE DEL DISPOSITIVO MICROFLUIDICO, E METODO DI USO DEL DISPOSITIVO MICROFLUIDICO"

di 1) STMICROELECTRONICS S.R.L.

di nazionalità italiana

con sede: VIA C. OLIVETTI, 2

AGRATE BRIANZA (MB)

di 2) BIOMERIEUX S.A.

di nazionalità francese

con sede: 5 RUE DES AQUEDUCS BP 10

69290 CRAPONNE (FRANCIA)

Inventori: SPOTO Giuseppe Emanuele, OCCHIPINTI Luigi Giuseppe, DALL'OGGIO Cristian, RENNA Crocifisso Marco Antonio, DRAZEK Laurent

*

La presente invenzione si riferisce ad un dispositivo microfluidico monouso, in particolare a un dispositivo monouso, o piattaforma, per l'amplificazione in tempo reale parallela multiplex come per esempio PCR (reazione a catena della

polimerasi) (Polymerase Chain Reaction).

La reazione a catena della polimerasi, o PCR, permette di accoppiare molte volte una quantità iniziale di DNA in una miscela di reazione adatta, aumentando così la quantità di quel DNA nel campione. La PCR consiste in cicli ripetuti di una fase di denaturazione, durante la quale la doppia elica del DNA viene separata, una fase di riassociazione durante la quale il primer si lega al DNA target, e una fase di estensione durante la quale il primer è allungato tramite DNA polimerasi, amplificando così selettivamente il DNA target. La PCR quantitativa in tempo reale è una tecnica ampiamente usata, basata sul monitoraggio della reazione PCR durante il suo progresso. Ciò può essere compiuto grazie a campioni fluorescenti adatti, che si legano o al DNA target o al DNA duplex, e permettono così al segnale di aumentare quando la reazione procede e il DNA è amplificato.

La PCR multiplex è l'amplificazione simultanea di più di una sequenza target in una singola reazione, e una PCR multiplex può anche essere svolta in un formato di saggio PCR in tempo reale. Le piattaforme PCR in tempo reale multiplex, note utilizzano saggi a base di sonde in cui ciascun DNA target ha una sonda specifica marcata con un

colorante fluorescente unico, determinando colori diversi osservati per ciascun saggio.

E' anche possibile utilizzare due traccianti per sonda, con un colorante fluorescente su una estremità e un quencher sull'altra estremità. Questa tecnologia è chiamata Molecular Beacon, reperibile in commercio da SIGMA-ALDRICH®, e descritta in US-A-5.925.517; US-A-6.034.130; US-B-6.103.476; US-B3 6.150.097; e US-B-6.461.817.

I molecular beacons sono molecole a forma di forcina con un fluoroforo spento internamente, la cui fluorescenza è ripristinata quando si legano ad una sequenza di acido nucleico target e quindi svolgono la forcina, separando i due traccianti che quindi non si spengono più reciprocamente, determinando un aumento di segnale.

La sonda Taqman è analoga alla sonda molecular beacon, avente due traccianti in stretta prossimità, che si spengono reciprocamente quando in una formazione di ansa a forcina. Tuttavia, la sonda TaqMan ibrida nel DNA target tra la coppia di primer, in modo tale che l'attività esonucleasi 5' della DNA polimerasi stacchi il fluoroforo, permettendo un aumento della fluorescenza.

Le sonda scorpion sono un'altra sonda PCR in tempo reale, avente traccianti doppi, che si spengono

uno con l'altro quando in una formazione di ansa a forcina. Le scorpions contengono un primer PCR legato in modo covalente alla sonda a forcina con traccianti spenti doppi. Durante una reazione PCR, il fluoroforo e il quencher sono separati, il che determina un aumento dell'emissione luminosa dalla provetta di reazione. La differenza importante tra questa tecnologia e Taqman è che in una reazione di scorpions la sonda e il target si trovano nella stessa molecola, per cui la generazione di segnale è attraverso un riarrangiamento uni-molecolare. Invece, una reazione Taqman richiede una collisione bi-molecolare.

Idealmente, una PCR multiplex in tempo reale dovrebbe essere in grado di rilevare, differenziare e fornire un risultato quantitativo per molti target diversi, senza che alcun singolo target influenzi il rilevamento di uno degli altri (cross-talk) e senza perdita di sensibilità. La piattaforma ideale dovrebbe pertanto permettere sia saggi multiplessati sia saggi paralleli in modo massiccio, per cui è possibile effettuare in una volta una grande quantità di saggi. Inoltre, la piattaforma dovrebbe richiedere solamente piccoli volumi e fornire molto rapidamente un risultato riproducibile, e piattaforme

microfluidiche sono state sviluppate per soddisfare questa esigenza.

Tuttavia, le piattaforme microfluidiche note nella tecnica anteriore non forniscono un parallelismo sufficiente (cioè un numero di camere di reazione che lavorano in parallelo), combinato a piccoli volumi di reagenti e campione (cioè meno di 300 nl per camera), elevata versatilità, facilità di impiego ed efficacia in termini di costi, tutte cose necessarie al fine di migliorare il cambiamento in scala di produzione in grandi volumi dei dispositivi monouso fabbricati e inoltre ridurre i costi generali della soluzione prevista, incluso il costo sia del dispositivo monouso che dei reagenti.

Inoltre, dispositivi microfluidici noti aventi una pluralità di camere di reazione o pozzetti formati in uno stesso substrato, risente ancora della contaminazione incrociata tra i pozzetti (fluido/reagente all'interno di una miscela di pozzetto con il fluido/reagente all'interno di un altro pozzetto). Questo inconveniente è identificabile in dispositivi microfluidici noti, indipendentemente dal particolare uso di vari dispositivi microfluidici.

Lo scopo della presente invenzione è fornire un dispositivo microfluidico monouso, che superi le

limitazioni summenzionate, in particolare un dispositivo microfluidico in cui una contaminazione incrociata tra pozzetti viene ridotta o eliminata durante l'uso, fornendo un grado elevato di parallelismo, e sfruttando piccoli volumi di campione, e velocità nel conseguire risultati.

Secondo la presente invenzione, è previsto un dispositivo microfluidico monouso, come definito nelle rivendicazioni allegate.

Per una migliore comprensione dell'invenzione, forme di realizzazione preferite della stessa sono ora descritte, puramente da un esempio non limitativo e con riferimento ai disegni allegati, in cui:

- la Figura 1a è una vista ingrandita di un dispositivo microfluidico secondo un aspetto della presente invenzione;

- la Figura 1b mostra una vista prospettica del dispositivo microfluidico della Figura 1a in forma assemblata;

- la Figura 2a è una vista ingrandita di un dispositivo microfluidico secondo un ulteriore aspetto della presente invenzione;

- la Figura 2b mostra una vista prospettica del dispositivo microfluidico della Figura 2a in una forma assemblata;

- la Figura 3a mostra una vista prospettica di un corpo del dispositivo microfluidico delle Figure 1a e 1b provvisto di una pluralità di pozzetti e canali;

- la Figura 3b è una vista ingrandita di una porzione del corpo della Figura 3a;

- la Figura 4a mostra una vista prospettica di un corpo di dispositivo microfluidico delle Figure 2a e 2b provvisto di una pluralità di pozzetti e canali;

- la Figura 4b è una vista ingrandita di una porzione del corpo della Figura 4a;

- la Figura 5a mostra una vista prospettica di uno strato di copertura atto a coprire il corpo della Figura 3a e il corpo della Figura 4a;

- la Figura 5b mostra una vista dall'alto dello strato di copertura della Figura 5a disposto sul corpo della Figura 3a o il corpo della Figura 4a;

- la Figura 5c mostra una vista dall'alto dello strato di copertura secondo un'ulteriore forma di realizzazione, alternativa alla forma di realizzazione della Figura 5a;

- la Figura 6 mostra una vista prospettica di uno strato di adesione, atto a formare un'interfaccia di accoppiamento tra il corpo della Figura 3a o 4a e lo strato di copertura della Figura 5a, oppure a formare un'interfaccia di accoppiamento tra lo strato

di copertura della Figura 5a e ulteriori strati disposti sopra lo stato di copertura;

- la Figura 7a mostra una vista prospettica di uno strato flessibile, atto ad essere disposto sopra lo strato di copertura della Figura 5a;

- la Figura 7b è una vista in sezione trasversale dello strato flessibile della Figura 7a, presa lungo la linea di sezione VII-VII della Figura 7a;

- la Figura 7c è una vista in sezione trasversale di una parte del dispositivo microfluidico della Figura 1b, in una prima condizione operativa;

- la Figura 7d è la stessa vista in sezione trasversale della Figura 7c, ma in una seconda condizione operativa;

- la Figura 8 mostra una vista prospettica di una membrana di separazione gas/liquido atta ad essere disposta sopra lo strato flessibile della Figura 7a;

- la Figura 9 mostra una vista espansa di una ulteriore forma di realizzazione del dispositivo microfluidico della presente invenzione;

- la Figura 10a mostra una vista prospettica di un corpo del dispositivo microfluidico della presente

invenzione, secondo un'ulteriore forma di realizzazione;

- la Figura 10b mostra una vista prospettica ingrandita di una porzione del corpo di Figura 10a;

- la Figura 11 è una vista espansa di un dispositivo microfluidico secondo una ulteriore forma di realizzazione della presente invenzione;

- la Figura 12a mostra una vista prospettica di uno strato di adesione secondo una forma di realizzazione alternativa allo strato di adesione della Figura 6;

- la Figura 12b è una vista ingrandita di una porzione dello strato di adesione della Figura 12a;

- la Figura 13 mostra una vista prospettica di una ulteriore forma di realizzazione del dispositivo microfluidico della presente invenzione;

- la Figura 14 è una vista dall'alto ingrandita di una porzione di ingresso del dispositivo microfluidico della Figura 13, secondo un aspetto della presente invenzione;

- la Figura 15 è una vista dall'alto ingrandita di una porzione di ingresso del dispositivo microfluidico della Figura 13, secondo un ulteriore aspetto della presente invenzione;

- la Figura 16 mostra il dispositivo microfluidico della Figura 13 quando caricato con un olio minerale per impedire l'evaporazione;

- la Figura 17 mostra una vista prospettica di un dispositivo di supporto atto ad alloggiare, durante l'impiego, il dispositivo microfluidico della Figura 1b e/o il dispositivo microfluidico della Figura 2b e/o il dispositivo microfluidico della Figura 9 e/o il dispositivo microfluidico della Figura 11;

- la Figura 18 è una prima porzione del dispositivo di supporto della Figura 17;

- la Figura 19 è una seconda porzione del dispositivo di supporto della Figura 17, atta ad accoppiarsi con la prima porzione della Figura 18;

- la Figura 20 mostra una vista prospettica di un dispositivo di supporto atto ad alloggiare, durante l'uso, il dispositivo microfluidico della Figura 9 e/o il dispositivo microfluidico della Figura 13;

- la Figura 21a mostra solamente il dominio fluidico di un dispositivo microfluidico secondo, per esempio, la presente invenzione del dispositivo microfluidico delle Figure 1a, 1b;

- la Figura 21b mostra il dominio fluidico del dispositivo microfluidico secondo un dispositivo

microfluidico comprendente un corpo del tipo mostrato nelle Figure 10a, 10b;

- la Figura 22a mostra una porzione ingrandita del dominio fluidico della Figura 21a;

- la Figura 22b mostra una porzione ingrandita del dominio fluidico della Figura 21b;

- la Figura 23 è una illustrazione di un sistema di un apparecchio per eseguire l'amplificazione dell'acido nucleico secondo un aspetto della presente invenzione;

- la Figura 24 mostra una vista dal lato posteriore del dispositivo microfluidico secondo una qualsiasi delle forme di realizzazione del dispositivo microfluidico della presente invenzione, comprendente un riscaldatore e/o un sensore della temperatura;

- la Figura 25 è una vista in sezione trasversale di una porzione del corpo di un dispositivo microfluidico secondo una qualsiasi delle forme di realizzazione del dispositivo microfluidico della presente invenzione;

- la Figura 26 è un profilo della temperatura utilizzato in un metodo per PCR secondo un aspetto della presente invenzione;

- la Figura 27 mostra simulazioni della dispersione e dello sfasamento termici all'interno di

una camera di reazione del dispositivo microfluidico mostrato nella Figura 28, quando viene applicato il profilo della temperatura della Figura 26;

- la Figura 28 mostra una porzione del corpo del dispositivo microfluidico comprendente una coppia di pozzetti 4 utilizzata per la simulazione della distribuzione della temperatura;

- le Figure 29a e 29b mostrano risultati di amplificazione simulata relativi ad una camera di reazione (linea tratteggiata) e una camera di controllo negativo adiacente (riga continua) di un dispositivo microfluidico avente un corpo come mostrato nella Figura 3b o 4b, dopo 40 cicli PCR con concentrazione target iniziale bassa e, rispettivamente, elevata;

- le Figure 30a e 30b mostrano risultati di amplificazione simulata, relativi a una camera di reazione (linea tratteggiata) e una camera di controllo (linea continua) di un dispositivo microfluidico avente un corpo come mostrato nelle Figure 3b o 4b, dopo 40 cicli PCR con una concentrazione target iniziale bassa e, rispettivamente, elevata, in un caso in cui la resa dell'amplificazione è più debole rispetto alla situazione delle Figure 29a, 29b;

- le Figure 31a e 31b mostrano risultati simulati relativi alla quantità dei fluorofori liberi rilasciati in entrambe le camere di reazione (curva tratteggiata) e di controllo (curva continua) di un dispositivo microfluidico avente un corpo come mostrato nelle Figure 3b o 4b, in funzione del numero di cicli PCR ad una concentrazione target iniziale bassa, e rispettivamente una concentrazione target iniziale elevata;

- le Figure 32 e 33 mostrano i risultati simulati relativi ad una camera di reazione (linea tratteggiata) e una camera di controllo (linea continua) di un dispositivo microfluidico avente un corpo come mostrato nelle Figure 10a e 10b, per una concentrazione target iniziale bassa e, rispettivamente, elevata; e

- le Figure 34a e 34b mostrano risultati simulati relativi alla quantità di fluorofori liberi rilasciati in entrambe le camere di reazione (curva tratteggiata) e di controllo (curva continua) di un dispositivo microfluidico avente un corpo come mostrato nella Figura 10a o 10b, in funzione del numero di cicli PCR a una concentrazione target iniziale bassa e, rispettivamente, una concentrazione target iniziale elevata.

Secondo una forma di realizzazione della presente invenzione, è previsto un dispositivo microfluidico comprendente un corpo (ad esempio un corpo semiconduttore che può essere processato secondo le tecniche di fabbricazione MEMS note) avente un primo lato e un secondo lato opposto uno all'altro, e avente sul primo lato del corpo: almeno una coppia di pozzetti o camere atta ad accumulare un fluido o un liquido; una regione di ingresso formata in un punto di entrata per il fluido o liquido da alimentare nei pozzetti; un canale principale collegato in modo fluidico alla regione di ingresso; e almeno una coppia di canali secondari che collega in modo fluidico il canale principale al pozzetto rispettivo.

I pozzetti si estendono all'interno del corpo per una prima profondità, il canale principale si estende all'interno del corpo per una seconda profondità, i canali secondari si estendono all'interno del corpo per una terza profondità, la prima profondità essendo maggiore della seconda profondità, e la seconda profondità essendo maggiore della terza profondità. I canali multi-livello e le camere multi-livello provvedono ad una contaminazione ridotta tra pozzetti.

Secondo un primo aspetto dell'invenzione summenzionata, i canali secondari sono accoppiati a lati opposti del canale principale e sono sfalsati uno rispetto all'altro. Questo riduce ulteriormente la contaminazione incrociata tra pozzetti poiché il percorso fluidico da un pozzetto a un pozzetto adiacente verrà aumentato. Si vedano, per esempio, le Figure 10a, 10b e la descrizione correlata.

Secondo un secondo aspetto della forma di realizzazione summenzionata (in combinazione con il primo aspetto summenzionato o in alternativa al primo aspetto), il dispositivo microfluidico comprende inoltre uno strato flessibile, disposto al disopra del primo lato del corpo, provvisto di almeno una sporgenza che si estende verso il primo lato del corpo e si sovrappone, almeno parzialmente, ai canali secondari. Durante l'uso, lo strato flessibile, a livello della protrusione, può essere spostato da una prima posizione a una seconda posizione, in modo tale che, nella prima posizione, la sporgenza sia al disopra del corpo e permetta il trasferimento di un fluido all'interno dei canali secondari, e nella seconda posizione, la sporgenza entri in contatto con il corpo ed entri all'interno di almeno uno dei canali secondari, isolando così in modo fluidico almeno un pozzetto dal canale principale. In

particolare, la sporgenza ostruisce completamente l'almeno un canale secondario (cioè, la sporgenza entra all'interno del canale secondario per l'intera profondità del canale secondario).

Secondo una forma di realizzazione, la sporgenza è realizzata in un materiale stampabile che viene sottoposto a deformazione in modo da entrare all'interno di tutti i canali secondari, isolando così in modo fluidico tutti i pozzetti dal canale principale uno dall'altro. In generale, lo strato flessibile è configurato in modo tale che quando una pressione viene applicata sullo stesso, la sporgenza entri in contatto con il primo lato del corpo ed entri all'interno di almeno uno dei canali secondari, isolando così in modo fluidico i pozzetti uno dall'altro. In questo modo, la contaminazione incrociata tra pozzetti è ancora ulteriormente ridotta.

La discussione che segue è presentata per permettere ad una persona esperta nell'arte di realizzare e utilizzare l'invenzione. Varie varianti relative alle forme di realizzazione risulteranno evidenti agli esperti nell'arte, senza in questo modo allontanarsi dalla portata della presente invenzione come rivendicata. Di conseguenza, la presente invenzione non deve essere intesa come limitata alle

forme di realizzazione illustrate, ma ad essa si deve garantire la più ampia portata in conformità con i principi e le caratteristiche illustrate nella presente descrizione e definiti nelle rivendicazioni allegate.

La Figura 1a mostra una vista espansa di un dispositivo microfluidico 1000 secondo una forma di realizzazione della presente invenzione. La Figura 1b mostra il dispositivo microfluidico 1000 nella Figura 1a montato. In riferimento ad entrambe le Figure 1a e 1b, il dispositivo microfluidico 1000 comprende un corpo 2, per esempio di materiale semiconduttore quale silicio o silicio monocristallino, avente una prima superficie 2a e una seconda superficie 2b opposte una all'altra. Altri materiali possono essere utilizzati per il corpo 2, come plastica (per esempio plastica biocompatibile), vetro, ceramica, metalli o addirittura altri materiali. Tuttavia, i materiali semiconduttori sono preferiti per i costi e la facilità di fabbricazione di precisione, e inoltre perché il silicio conduce il calore molto bene.

Il corpo 2 alloggia, sulla prima superficie 2a, uno o più pozzetti 4 connessi a una rete di canali 6. I pozzetti 4 e la rete di canali 6 sono formati nel corpo 2 tramite tecniche di micro fabbricazione note (tecnologia MEMS), come litografia e attacco chimico.

Sopra la prima superficie 2a del corpo 2, è disposto un cappuccio 8, realizzato di materiale rigido o semirigido, per esempio di polimeri plastici biocompatibili, trasparenti e non fluorescenti, come per esempio, ma senza limitazioni, policarbonato o poliacrilato. Il cappuccio 8 ha uno spessore da 50 μm a 150 μm , per esempio pari a circa 100 μm . Secondo una prima forma di realizzazione della presente invenzione, il cappuccio 8 è fissato alla prima superficie 2a del corpo 2 mediante colla (non mostrata), come per esempio, ma senza limitazioni, una colla iniettabile costituita da materiali trasparenti e non fluorescenti e induribile alle basse temperature, come per esempio colle al ciano acrilato o a base di epossidi.

Il cappuccio 8 è atto a entrare in contatto con la prima superficie 2a del corpo 2 in modo da sigillare la rete di canali 6 dall'alto. Per permettere una sigillatura ermetica dei canali 6 mediante il cappuccio 8, è opportuno munire la prima superficie 2a del corpo 2 di una o più scanalature 10 delineanti i pozzetti 4 e/o i canali 6. Le scanalature 10 trattengono e controllano la colla, che è collocata all'interno delle scanalature 10 prima di disporre il cappuccio 8 al di sopra del corpo 2. In questo modo, la colla non determina una

distanza indesiderabile tra la prima superficie 2a del corpo 2 e il cappuccio 8, che potrebbe impedire la chiusura a tenuta dei canali 6 da parte del cappuccio 8; inoltre, dato che la colla è confinata all'interno delle scanalature 10, la colla non può ostruire (né completamente né parzialmente) i canali 6.

Sopra il cappuccio 8 è disposto un primo strato 12 biadesivo, avente un lato adesivo aderente al cappuccio 8 e l'altro lato adesivo che si lega allo strato in alto 14. Il primo strato 12 biadesivo a uno spessore da 10 μm a 100 μm , per esempio pari a circa 50 μm .

Su forme di realizzazione preferite, il primo strato biadesivo 12 comprende un supporto di film trasparente con un motivo avente due lati. Un lato del supporto rivestito mediante un adesivo sensibile alla pressione (per esempio, silicone), mentre il lato opposto è rivestito con un adesivo su base acrilica.

Sopra il primo strato 12 biadesivo, è disposto uno strato flessibile 14, di un materiale biocompatibile, per esempio di materiale elastomerico, in particolare, in una forma di realizzazione, di PDMS (polidimetilsilossano), oppure, in un'altra forma di realizzazione, PMMA

(polimetil-metacrilato)), oppure, in ancora un'altra forma di realizzazione, di silicone. Lo strato flessibile 14 aderisce a un altro lato del primo strato biadesivo 12. In questo modo, il primo strato biadesivo 12 è disposto tra il cappuccio 8 e lo strato flessibile 14, ed accoppia lo strato flessibile 14 al cappuccio 8.

Lo strato flessibile 14 è provvisto di sporgenze 74 (descritte in dettaglio in riferimento alle Figure 7a, 7b) configurate in modo da estendersi attraverso il primo strato biadesivo 12 e il cappuccio 8. Di conseguenza, il primo strato biadesivo 12 e il cappuccio sono provvisti di aperture per permettere il passaggio delle sporgenze 74.

Lo strato flessibile 14 ha uno spessore minimo (sporgenze 74 escluse) nell'ordine da 100 μm a 500 μm , per esempio di circa 150 μm .

Sopra lo strato flessibile 14, è disposta una membrana 16, atta ad agire come separatore di gas/liquido. La membrana 16 è una membrana microporosa, per esempio realizzata di polipropilene, polietilene, poliviniltetrafluoroetilene, policarbonato e altre membrane porose idrofobiche, la quale è configurata per permettere il passaggio di un gas (per esempio aria), ma non permette il passaggio di alcun liquido. Secondo una forma di realizzazione,

la membrana ha una dimensione dei pori da circa 50 nm a circa 150 nm, per esempio di circa 100 nm, e non dovrebbe interferire con la fluorescenza dei materiali attivi e il sistema di rilevamento.

Ciascuno degli strati 8, 12, 14 e 16 è munito di un rispettivo foro di ingresso, che si allinea e forma un ingresso 3 quando il dispositivo microfluidico 1000 è montato come mostrato nella Figura 1b. Il canale di ingresso 3 si estende dalla membrana 16 al corpo 2, e permette un accesso fluidico alla rete di canali 6, durante l'uso del dispositivo microfluidico 1000.

Ciascuno degli strati 8, 12 e 14 (ma non la membrana 16) è inoltre provvisto di un rispettivo foro di scarico dell'aria 52, 62, 72. Quando il dispositivo microfluidico 1000 è montato come mostrato nella Figura 1b, i fori di sfiato dell'aria 52, 62, 72 si allineano per formare un microcanale 5 di scarico dell'aria che si estende dallo strato flessibile 14 al corpo 2. I microcanali di scarico dell'aria 5 sono accoppiati in modo fluidico ai pozzetti 4 e permettono un flusso dell'aria fuori dai pozzetti 4 quando, durante l'uso del dispositivo microfluidico 1000, vengono riempiti con liquido. La membrana 16 copre i microcanali 5 di scarico dell'aria in modo da bloccare un flusso di liquido

fuori dai pozzetti 4 attraverso i microcanali 5 di uscita dell'aria. La membrana 16 ha uno spessore da 50 μm a 300 μm , per esempio pari a circa 100 μm .

La Figura 2a mostra una vista esplosa di un dispositivo microfluidico 1001 secondo un prima forma di realizzazione della presente invenzione. La figura 2b mostra il dispositivo microfluidico 1001 assemblato.

Secondo la forma di realizzazione del dispositivo microfluidico 1001 mostrato nella Figure 2a e 2b, il cappuccio 8 è fissato alla prima superficie 2a del corpo 2 per mezzo di un secondo strato 20 biadesivo, invece della colla come in Figura 1. Il secondo strato biadesivo 20 ha un lato adesivo a diretto contatto con la prima superficie 2a del corpo 2, un lato adesivo opposto a contatto col cappuccio 8. In questo modo, il cappuccio 8 è fissato al corpo 2 per mezzo del secondo strato 20 biadesivo, che funge da strato di incollaggio.

In forme di realizzazione preferite, il secondo strato biadesivo 20 comprende un supporto di pellicola trasparente con un motivo avente due lati. Un lato del supporto rivestito mediante un adesivo sensibile alla pressione (per esempio silicone), mentre il lato opposto è rivestito mediante un

adesivo su base acrilica, tuttavia, gli adesivi possono variare.

La colla, come descritta in riferimento alla forma di realizzazione delle 1a, 1b, non è un requisito per la forma di realizzazione delle Figure 2a, 2b. Di conseguenza, anche le scanalature 10 non sono necessarie.

È chiaro che, secondo ulteriori forme di realizzazione (non mostrate), può essere utilizzato qualsiasi altro elemento di accoppiamento per fissare il cappuccio 8 allo strato semiconduttore. Per esempio, gli strati possono essere incollati, fatti aderire, serrati assieme, saldati a caldo, saldati RF, saldati a ultrasuoni, saldati a solvente, saldati a laser, oppure qualsiasi altro mezzo noto nell'arte, e a seconda dei materiali utilizzati.

La Figura 3a mostra una vista prospettica del corpo 2 secondo la forma di realizzazione della Figura 1a; la Figura 3b mostra una vista ingrandita di una porzione selezionata del primo lato 2a del corpo 2 della Figura 3a (la porzione mostrata in Figura 3b è racchiusa da una linea tratteggiata in Figura 3a).

Il corpo 2 ha uno spessore da circa 500 μm a circa 800 μm , per esempio pari a circa 675 μm .

Il corpo 2 secondo la Figura 3a comprende una regione di ingresso 30, configurata per ricevere un liquido. La regione di ingresso 30 è una regione di ingresso comune 30 per tutti i canali 6 dei pozzetti 4 formati dal corpo 2. La regione di ingresso 30 è incisa nel corpo 2 e ha una profondità, misurata dal primo lato 2a lungo un asse Z, che va da circa 100 μm a circa 150 μm , per esempio pari a circa 120 μm . La regione di ingresso 30 come mostrato ha una forma sostanzialmente cilindrica. Tuttavia, sono possibili altre forme, per esempio la forma cubica, la forma a parallelepipedo o qualsiasi altra forma.

In maggior dettaglio, la rete di canali 6 comprende un canale principale 6a, collegato direttamente alla regione di ingresso 30. Il canale principale 6a comprende una pluralità di diramazioni principali 6a' e diramazioni secondarie 6a''.

Lo scopo delle diramazioni principali 6a' e delle diramazioni secondarie 6a'' è di formare una rete adatta per fornire alla pluralità di pozzetti 4 il liquido iniettato, durante l'uso sulla zona di ingresso 30. Risulta evidente che la conformazione, l'estensione e/o il numero delle diramazioni 6a' e diramazioni secondarie 6a'' è liberamente selezionabile a seconda delle esigenze degli utenti. Per esempio, può essere previsto un singolo canale

principale 6a (senza ulteriori diramazioni), ramificazioni aggiuntive possono essere aggiunte, oppure il modello delle ramificazioni può essere variato.

Una pluralità di canali trasversali 6b si irradia dalle diramazioni secondarie 6a"). Ciascun canale 6b trasversale è inoltre accoppiato in modo fluidico ad un rispettivo pozzetto 4, in modo tale che il liquido iniettato sulla regione di ingresso 30 sia fornito ai pozzetti 4 attraverso la rete di canali 6.

Secondo la forma di realizzazione della Figura 3a, i pozzetti 4 sono organizzati come una serie ordinata avente una o più file (lungo un asse X) e una o più colonne (lungo un asse Y). In particolare, i pozzetti 4 che sono connessi a una stessa ramificazione secondaria 6a", e si estendono su uno stesso lato della diramazione secondaria 6a" cui essi sono connessi, sono sostanzialmente allineati uno all'altro lungo una direzione parallela all'asse Y. Analogamente, pozzetti 4 collegati alla stessa diramazione secondaria 6a", ma sul lato opposto della stessa, sono a loro volta sostanzialmente allineati.

Ciascuno dei pozzetti 4 è collegato in modo fluidico ad una rispettiva regione di uscita dell'aria 32, chiaramente visibile nella Figura 3b,

partendo da un lato del rispettivo pozzetto 4. La regione di uscita 32 dell'aria ha la forma di una strisca o scanalatura incisa nel corpo 2 sulla prima superficie 2a.

Durante l'uso, quando il liquido viene fornito alla regione di ingresso 30, fluisce dalla regione di ingresso 30 lungo un canale principale 6a alle diramazioni 6a', quindi alle diramazioni secondarie 6a'', che alimentano pozzetti 4 individuali attraverso canali trasversali 6b individuali. Data la piccola dimensione dei canali 6 (nell'intervallo di micrometri), il flusso del liquido è azionato tramite azione capillare fino a che il liquido non entra nei pozzetti 4. La regione di uscita dell'aria 32 ha la funzione di permettere all'aria intrappolata di uscire dai pozzetti 4 quando il liquido entra nei pozzetti 4.

Secondo un'altra forma di realizzazione della presente invenzione, il flusso del liquido è guidato da una pressione positiva applicata in modo di per sé noto. In alternativa, il flusso può essere guidato da una pressione negativa se una camera a valle è chiusa a tenuta durante una pressione negativa. Rompendo una valvola, cioè, applicando calore e fondendo una valvola a membrana, questo inizierà a fluire verso la camera a pressione negativa.

Secondo una forma di realizzazione della presente invenzione, il canale principale 6a (che, nella realizzazione mostrata, è formato dalle diramazioni 6a' e 6a'') si estende all'interno del corpo 2 per una profondità D_{MC} , misurata dalla prima superficie 2a del corpo 2 lungo l'asse Z, che va da circa 100 μm a circa 150 μm , per esempio pari a circa 120 μm . In particolare, il canale principale 6a ha una profondità D_{MC} che è pari a, o maggiore della profondità della regione di ingresso 30. Inoltre, il canale principale 6a ha una larghezza W_{MC} di circa 110-130 μm .

I canali trasversali 6b si estendono all'interno del corpo 2 per una profondità D_{CC} , misurata dalla prima superficie 2a del corpo 2 lungo l'asse Z, inferiore alla profondità D_{MC} del canale 6a principale, e che va da circa 6 μm a circa 12 μm , per esempio pari a circa 10 μm quando il canale principale 6a ha una profondità D_{MC} di circa 120 μm . Inoltre, ciascun canale trasversale 6b ha una larghezza W_{CC} di circa 50-70 μm .

I pozzetti 4 si estendono all'interno del corpo 2 per una profondità D_W , misurata dalla prima superficie 2a del corpo 2 lungo l'asse Z, maggiore delle profondità D_{MC} , D_{CC} dei canali principale e trasversale 6a, 6b, e va da circa 200 μm a circa 600

μm , per esempio nell'ordine di circa $380\ \mu\text{m}$ quando il canale principale 6a ha una profondità D_{MC} di circa $120\ \mu\text{m}$ e i canali trasversali 6b hanno una profondità D_{CC} di circa $10\ \mu\text{m}$. Ciascun pozzetto 4, da una vista dall'alto, è mostrato come avente una forma poligonale, per esempio forma quadrangolare, ma qualsiasi forma è possibile, come per esempio una forma circolare o qualsiasi altra forma.

In questo modo, il flusso fluisce verso valle dagli ingressi dei canali verso i pozzetti, e questa caratteristica è utile per ridurre la contaminazione incrociata.

La regione di uscita dell'aria 32 si estende all'interno del corpo 2 per una profondità, misurata dalla prima superficie 2a del corpo 2 lungo l'asse Z, che è inferiore allo spessore del pozzetto 4 cui esso è accoppiato (per esempio, pari a una profondità D_{CC} dei canali trasversali 6b).

Come risulta più chiaramente visibile nella Figura 3b, le scanalature 10 circondano, almeno parzialmente, la rete di canali 6 e i pozzetti 4. In particolare, le scanalature 10 si estendono tra i pozzetti 4 adiacenti non separati dalle diramazioni secondarie 6a". In questo modo, quando il cappuccio 8 viene incollato al corpo 2, si assicura che i pozzetti 4 adiacenti siano isolati fisicamente uno

dall'altro e sia evitata una contaminazione incrociata. Le scanalature 10 hanno una profondità, all'interno del corpo 2, misurata partendo dalla prima superficie 2a lungo l'asse Z, nell'ordine di circa 60-150 μm , per esempio di circa 120 μm .

Abbiamo mostrato una coppia di scanalature 10, in quanto due linee di colla forniscono una chiusura a tenuta ridondante a basso costo, ma è possibile qualsiasi numero. Inoltre, le scanalature 10 sono mostrate in modo da tracciare fedelmente il pozzetto e l'uscita dell'aria, ma l'esatto layout delle scanalature può essere variato, purché i pozzetti siano separati o definiti uno rispetto all'altro.

La Figura 4a mostra una vista prospettica del primo lato 2a del corpo 2 secondo la forma di realizzazione del dispositivo microfluidico 1001 della Figura 2a; la Figura 4b mostra una vista ingrandita di una porzione selezionata del primo lato 2a del corpo 2 della Figura 4a (la porzione mostrata in Figura 4b è racchiusa da una linea tratteggiata in Figura 4a). La forma di realizzazione delle Figure 4a, 4b è analoga alla forma di realizzazione delle Figure 3a, 3b, ma le scanalature 10 sono omesse poiché al loro posto viene utilizzato uno strato biadesivo. Elementi della forma di realizzazione delle Figure 4a, 4b comuni ai rispettivi elementi

della forma di realizzazione delle Figure 3a, 3b sono dotati dello stesso numero di riferimento e non saranno ulteriormente descritti.

Secondo la forma di realizzazione delle Figure 4a, 4b, l'adesione tra il corpo 2 e il cappuccio 8, nonché l'isolamento tra pozzetti adiacenti 4, viene ottenuta per mezzo del secondo strato biadesivo 20.

Sempre mostrato in Figura 4a, il modello dei canali 6 è più semplice, e le diramazioni 6a' e 6" si sviluppano nel corpo 2 con un modello continuo.

Le Figure 5a, 5b, 6, 7a, 7b e 8 rispettivamente mostrano in maggiore dettaglio forme di realizzazione di: il cappuccio 8 (Figure 5a, 5b); il primo strato 12 biadesivo (Figura 6); lo strato flessibile 14 (Figura 7a, 7b); e la membrana 16 (Figura 8). Facendo riferimento alla Figura 5a, il cappuccio 8 è mostrato in una vista prospettica. Il cappuccio 8 ha uno spessore da circa 10 μm a circa 100 μm , per esempio pari a circa 50 μm . Il cappuccio 8 comprende una pluralità di aperture formate completamente attraverso esso. In particolare, il cappuccio 8 comprende un foro di ingresso 50 avente una forma circolare (tuttavia, è possibile qualsiasi altra forma). Il foro di ingresso 50 è formato in una regione del cappuccio 8 in modo tale che quando il cappuccio 8 è disposto al disopra del corpo 2, il

foro di ingresso 50 sia sostanzialmente allineato (lungo l'asse Z) con la regione di ingresso 30 del corpo 2, in modo tale che la regione di ingresso 30 sia accessibile per immettere un liquido (per esempio, utilizzare una pipetta, non mostrata).

Il cappuccio 8 comprende inoltre una pluralità di fori di sfiato dell'aria 52, mostrati qui come aventi una forma circolare (tuttavia possono essere scelte altre forme, generalmente poligonali). I fori di sfiato dell'aria 52 sono formati in una regione del cappuccio 8 in modo tale che quando il cappuccio 8 è disposto sopra il corpo 2, ciascun foro di sfiato dell'aria 52 sia disposto al disopra, e all'incirca allineato (lungo l'asse Z), con una rispettiva regione di uscita dell'aria 32, essendo in questo modo in comunicazione di fluido con la rispettiva regione di uscita dell'aria 32.

Il cappuccio 8 comprende inoltre una pluralità di fori di valvola 54, aventi qui una forma poligonale, per esempio una forma quadrangolare (ma possono essere scelte altre forme, per esempio forme circolari od ovali). Ciascun foro di valvola 54 è formato in una regione del cappuccio 8 in modo tale che quando il cappuccio 8 è disposto sopra il corpo 2, ciascun foro di valvola 54 si estenda (quando considerato in vista dall'alto) tra due pozzetti 4

rivolti verso la stessa diramazione secondaria 6a" e allineati lungo l'asse X. In particolare, il foro di valvola 54 si estende al disopra di una regione del corpo 2, alloggiante i due canali trasversali 6b accoppiati direttamente in modo fluidico ai pozzetti 4 rivolti verso la stessa diramazione secondaria 6a".

La Figura 5b mostra una vista dall'alto del cappuccio 8 disposta sopra il corpo 2, come descritto. Secondo una forma di realizzazione, quando il cappuccio 8 è disposto sopra il corpo 2, ciascun foro di valvola 54 non si sovrappone (né parzialmente, né completamente) con nessuno dei pozzetti 4. Tuttavia, è possibile ed è tollerata una parziale sovrapposizione, dovuta a disallineamenti.

Secondo un'altra forma di realizzazione, mostrata nella Figura 5c (vista dall'alto), il cappuccio 8 comprende ulteriori aperture sopra i pozzetti 4 (cioè, ciascuna apertura è allineata lungo l'asse Z, con un rispettivo pozzetto 4) al fine di migliorare la trasparenza dei pozzetti di reazione e semplificare il rilevamento quando basato sulla fluorescenza.

La Figura 6 mostra, in una vista prospettica, il primo strato biadesivo 12. Il secondo strato biadesivo 20, secondo la forma di realizzazione delle Figure 2a, 2b ha la stessa forma e la stessa

struttura del primo strato biadesivo 12 della Figura 6. Di conseguenza, la seguente descrizione, diretta al primo strato 12 biadesivo, si applica in modo analogo al secondo strato 20 biadesivo.

Il primo strato 12 biadesivo ha uno spessore da circa 10 μm a circa 100 μm , per esempio pari a circa 50 μm . Il primo strato 12 biadesivo comprende una pluralità di aperture formate completamente attraverso esso, in modo analogo alla descrizione del cappuccio 8 della Figura 5a. Un foro di ingresso 60 è formato attraverso il primo strato 12 biadesivo e ha una forma circolare, oppure la forma scelta per il foro di ingresso 50 del cappuccio 8.

Il foro di ingresso 60 è formato in una regione del primo strato biadesivo 12 in modo tale che, quando il primo strato biadesivo 12 è disposto al disopra del corpo 2, il foro di ingresso 60 sia sostanzialmente allineato, lungo l'asse Z, con il foro di ingresso 50 del cappuccio 8, in modo tale che quando il foro di ingresso 60 sia a sua volta sostanzialmente allineato, lungo l'asse Z, con la regione di ingresso 30 del corpo 2.

Il primo strato 12 biadesivo comprende inoltre una pluralità di fori di sfiato dell'aria 62, aventi qui una forma circolare (tuttavia sono possibili altre forme, generalmente poligonali). I fori di

sfiato dell'aria 62 sono formati in una regione del primo strato biadesivo 12 in modo tale che, quando il primo strato biadesivo 12 è disposto sopra il corpo 2, ciascun foro di sfiato dell'aria 62 sia disposto sopra una rispettiva regione 32 di uscita dell'aria, in comunicazione di fluido con la rispettiva regione di uscita dell'aria 32 attraverso i fori di sfiato dell'aria 52 del cappuccio 8.

Il primo strato biadesivo 12 comprende inoltre una pluralità di fori di valvola 64, aventi qui (da una vista dall'alto) una forma poligonale, per esempio una forma quadrangolare, ma altre forme, come per esempio circolare od ovale sono possibili. In particolare, i fori di valvola 64 hanno la stessa forma dei fori di valvola 54 del cappuccio 8, sebbene questo non sia essenziale.

Ciascun foro di valvola 64 è formato in una regione del primo strato biadesivo 12 in modo tale che, quando il primo strato biadesivo 12 è disposto sopra il corpo 2, ciascun corpo di valvola 64 sia disposto (se considerato da una vista dall'alto) tra due pozzetti 4 rivolti verso la stessa diramazione secondaria 6a", sopra una regione del corpo 2 alloggiante i due canali 6b trasversali accoppiati direttamente in modo fluidico ai summenzionati

pozzetti 4 rivolti verso la stessa diramazione secondaria 6a".

Quando il primo strato 12 biadesivo è disposto come mostrato nelle Figure 1a e 1b, il foro di ingresso 60 del primo strato biadesivo 12 è sostanzialmente allineato lungo l'asse Z, con il foro di ingresso 50 del cappuccio 8. I fori di sfiato dell'aria 62 del primo strato biadesivo 12 sono quindi sostanzialmente allineati, lungo l'asse Z, con i fori di sfiato dell'aria 52 del cappuccio 8. Inoltre, i fori di valvola 64 del primo strato 12 biadesivo sono sostanzialmente allineati, lungo l'asse Z, con i fori di valvola 54 del cappuccio 8.

La Figura 7a mostra una vista prospettica dello strato flessibile 14. Lo strato flessibile 14 comprende un foro di ingresso 70, formato attraverso lo strato flessibile 14 e avente una forma circolare (oppure la stessa forma scelta per i summenzionati fori di ingresso 50, 60 del cappuccio 8 e il primo strato biadesivo 12, oppure qualsiasi altra forma desiderata). Il foro di ingresso 70 è formato in una regione dello strato flessibile 14, in modo tale che quando lo strato flessibile 14 è disposto sopra il corpo 2, il foro di ingresso 70 sia sostanzialmente allineato, lungo l'asse Z, con la regione di ingresso 30 del corpo 2. Di conseguenza, il foro di ingresso

70 è a sua volta sostanzialmente allineato, lungo l'asse Z, con il foro di ingresso 50 del cappuccio 8 e il foro di ingresso 60 del primo strato biadesivo 12 in modo tale che la regione di ingresso 30 sia accessibile per aggiungere fluidi al dispositivo.

Lo strato flessibile 14 comprende inoltre una pluralità di fori di sfiato dell'aria 72, aventi una forma circolare (tuttavia, altre forme sono possibili, generalmente poligonali). I fori di sfiato dell'aria 72 sono formati in una regione dello strato 14 flessibile in modo tale che quando lo strato flessibile 14 è disposto sopra il corpo 2, ciascun foro di sfiato dell'aria 72 sia disposto sopra e in comunicazione di fluido con una rispettiva regione 32 di uscita dell'aria, attraverso i fori di sfiato dell'aria 52 e 72. I fori di sfiato dell'aria 72, i fori di sfiato dell'aria 62 e i fori di sfiato dell'aria 52 sono sostanzialmente allineati verticalmente (cioè, allineati lungo l'asse Z) per formare un rispettivo microcanale 5 di sfiato dell'aria.

Lo strato flessibile 14 comprende inoltre una pluralità di sporgenze 74 che si estende da una superficie dello strato 14 flessibile (si veda anche Figura 7b, che mostra una vista in sezione dello strato flessibile 14, presa lungo la linea in sezione

VII-VII della Figura 7a). Le sporgenze 74 hanno una forma poligonale tale per cui, quando lo strato flessibile 14 è montato sopra il cappuccio 8 e il primo strato 12 biadesivo, le sporgenze 74 si estendono attraverso i fori di valvola 54 e 64 avvicinandosi (o entrando in contatto) alla prima superficie 2a del corpo 2 nella regione della prima superficie 2a dove sono formati i canali trasversali 6b (cioè, tra due pozzetti 4 rivolti uno verso l'altro lungo l'asse X). Pertanto, lo spessore delle sporgenze 74 è sostanzialmente uguale alla somma degli spessori del cappuccio 8 e il primo strato 12 biadesivo.

Secondo una differente forma di realizzazione, lo spessore delle sporgenze 74 è superiore rispetto alla somma degli spessori del cappuccio 8 e il primo strato 12 biadesivo, per esempio superiore di una quantità pari alla profondità D_{cc} dei canali trasversali 6b.

Secondo ancora una differente forma di realizzazione, lo spessore delle sporgenze 74 è inferiore rispetto alla somma degli spessori del cappuccio 8 e il primo strato biadesivo 12.

La Figura 7c mostra una sezione trasversale di una porzione del dispositivo microfluidico della Figura 1b, in cui la sporgenza 74 entra in contatto

con il corpo 2, ma non entra all'interno del canale trasversale 6b. Un fluido è quindi libero di fluire attraverso il canale trasversale 6b.

Indipendentemente dalla forma di realizzazione selezionata per lo spessore delle sporgenze 74, durante l'utilizzo, le sporgenze 74 sono premute (Figura 7d) contro il corpo 2 in modo tale che almeno parte delle sporgenze 74 entri all'interno dei canali secondari 6b, ostruendo i canali secondari 6b. Questo può essere ottenuto, per esempio, utilizzando il supporto del dispositivo mostrato nelle Figure 17-19 descritto più avanti.

Lo strato flessibile 14 ha uno spessore d_{FL} (non comprendente le sporgenze 74) da circa 100 μm a circa 500 μm , per esempio pari a circa 150 μm .

Quando si considera la forma di realizzazione del dispositivo microfluidico 1001 delle Figure 2a, 2b, lo spessore delle sporgenze 74 è sostanzialmente pari alla somma degli spessori del cappuccio 8, il primo strato biadesivo 12, e il secondo strato biadesivo 20. In particolare, ciascuna sporgenza 74 riempie completamente lo spazio dei fori di valvola risultanti dall'impilatura del cappuccio 8, il primo strato biadesivo 12 e il secondo strato biadesivo 20.

Secondo un'altra forma di realizzazione del dispositivo microfluidico 1001 delle Figure 2a, 2b,

lo spessore delle sporgenze 74 è superiore rispetto alla somma degli spessori del cappuccio 8, il primo strato biadesivo 12, e il secondo strato biadesivo 20, per esempio è sufficientemente spesso da penetrare e bloccare i canali trasversali 6b.

Secondo una forma di realizzazione ancora diversa del dispositivo microfluidico 1001, lo spessore delle sporgenze 74 è inferiore rispetto alla somma degli spessori del cappuccio 8, il primo strato biadesivo 12 e il secondo strato biadesivo 20, in modo tale che si assicuri che non interferiscano con il liquido che fluisce attraverso la rete di canali 6 durante la fase di alimentazione dei pozzetti 4.

Indipendentemente dalla forma di realizzazione scelta per lo spessore della sporgenza del dispositivo microfluidico 1001, durante l'uso, le sporgenze 74 possono essere azionate come già descritto in riferimento alle Figure 7c e 7d.

La Figura 8 mostra una vista prospettica della membrana 16. La membrana 16 è atta a coprire, quando disposta sopra lo strato flessibile 14 come mostrato nelle Figure 1a, 1b e Figure 2a, 2b, i fori di sfiato dell'aria 72 in modo da chiudere i microcanali di sfiato dell'aria 5. Come asserito, la membrana 16 è una membrana microporosa configurata per permettere il passaggio dei gas (per esempio, aria) attraverso

di essa, impedendo il passaggio di un liquido. La membrana è incollata allo strato elastomerico. La membrana permette al gas di fuoriuscire, permettendo il flusso del fluido nei pozzetti; è inoltre possibile prevenire una contaminazione incrociata del fluido attraverso gli sfiati dell'aria.

La membrana 16 ha uno spessore da circa 50 μm a 300 μm , ad esempio pari a circa 100 μm . La membrana 16 ha un foro di ingresso 80, formato completamente attraverso la membrana 16. Il foro di ingresso 80 è formato in una regione della membrana 16, in modo tale che quando la membrana 16 è disposta sopra il corpo 2, il foro di ingresso 80 sia sostanzialmente allineato, lungo l'asse Z, con la regione di ingresso 30 del corpo 2 in modo tale che non sia di impedimento per l'iniezione del liquido sulla zona di ingresso 30. Di conseguenza, il foro di ingresso 80 è anche sostanzialmente allineato, lungo l'asse Z, con: il foro di ingresso 50 del cappuccio 8, il foro di ingresso 60 del primo strato biadesivo 12 e il foro di ingresso 70 dello strato flessibile 14.

La membrana 16 è sagomata come una pluralità di strisce 82 atte a chiudere o bloccare i microcanali di sfiato dell'aria 5 in modo tale che il flusso del fluido attraverso la membrana 16 sia impedito, mentre

viene permesso il flusso del gas (per esempio, aria) attraverso la membrana 16.

Tra strisce 82 adiacenti della membrana 16, è formata una pluralità di aperture 84 in modo tale che quando la membrana 16 è disposta sopra lo strato flessibile 14, i pozzetti 4 formati nel corpo 2 non siano coperti dalla membrana 16. In questo modo, i pozzetti 4 sono accessibili otticamente dall'esterno del dispositivo microfluidico 1000, 1001.

La necessità di una accessibilità ottica dei pozzetti 4 richiede che anche il cappuccio 8, il primo strato biadesivo 12, lo strato flessibile 14 e il secondo strato biadesivo 20 (quando presente), siano trasparenti rispetto ad almeno la lunghezza d'onda di interesse rispetto al saggio. Se la membrana 16 dovesse essere trasparente alla stessa lunghezza d'onda scelta, le aperture 84 non sono necessarie.

Durante l'uso, i pozzetti 4 possono essere riempiti con un liquido, utilizzando, per esempio, una micropipetta (non mostrata), iniettando un campione di liquido sulla regione di ingresso 30, che è accessibile attraverso il canale di ingresso 3 formato dai fori di ingresso 50, 60, 70 e 80. Il liquido così iniettato fluisce dalla regione di ingresso 30, per azione capillare, attraverso il

canale principale 6a e i canali trasversali 6b, ed entra nei pozzetti 4.

Eventuale aria che potrebbe essere intrappolata all'interno della rete di canali 6 e i pozzetti 4 durante la fabbricazione è libera di fluire fuori dai pozzetti 4 attraverso le regioni di uscita 32, il microcanale di sfiato dell'aria 5, e la membrana 16. Il liquido che entra nei pozzetti 4 può anche riempire gli spazi vuoti dei microcanali di sfiato dell'aria 5, ma non può fluire attraverso la membrana 16. Il liquido è pertanto confinato all'interno del dispositivo microfluidico 1000, 1001 (in particolare all'interno dei pozzetti 4).

Secondo un aspetto della presente forma di realizzazione, tutti i pozzetti 4, durante l'uso del dispositivo microfluidico 1000, 1001 sono isolati in modo fluidico uno dall'altro, in modo tale che si evitino interferenze tra i pozzetti 4 (per esempio, il liquido presente in un primo pozzetto 4 non si mescoli con il liquido in un pozzetto 4 adiacente). In una forma di realizzazione delle Figure 3a, 3b, l'isolamento fluidico tra pozzetti 4 adiacenti è garantito dalla presenza delle scanalature 10, che si estendono intorno ai pozzetti 4 e chiudono a tenuta il cappuccio 8 verso il corpo 2, in particolare nella regione tra pozzetti adiacenti 4, lungo l'asse Y.

Nella forma di realizzazione delle Figure 4a, 4b, l'isolamento fluidico tra pozzetti 4 adiacenti è garantito dalla presenza del secondo strato 20 biadesivo, che aderisce sulla prima superficie 2a del corpo 2, in particolare nella regione tra pozzetti 4 adiacenti lungo l'asse Y, interrompendo così qualsiasi percorso fluidico indesiderato tra pozzetti 4 lungo l'asse Y.

Gli altri percorsi fluidici tra pozzetti 4 sono interrotti per mezzo delle sporgenze 74. Al fine di ottenere un buon contatto (cioè, a tenuta d'acqua) tra le sporgenze 74 del corpo 2, lo strato flessibile 14 è premuto, durante l'uso, verso il corpo 2 in modo tale che le sporgenze 74 fungano da pistoncini, che entrano in contatto con il primo lato 2a del corpo 2, entrano nei canali 6b trasversali, chiudendo così i canali trasversali 6b. I pozzetti 4, in questo modo, sono completamente isolati in modo fluidico uno dall'altro.

La Figura 9 mostra un'ulteriore forma di realizzazione della presente invenzione. Elementi della Figura 9, che sono uguali ai dispositivi 1000 e 1001 descritti in precedenza, sono etichettati con lo stesso numero di riferimento e non ulteriormente descritti.

Secondo una forma di realizzazione della Figura 9, un dispositivo 1002 microfluidico comprende il corpo 2 avente il primo lato 2a e il secondo lato 2b opposti uno all'altro. Il corpo 2, secondo un aspetto della presente invenzione, è di materiale semiconduttore, per esempio silicio. Tuttavia, possono essere utilizzati altri materiali per il corpo 2, per esempio materiali plastici (per esempio, plastica biocompatibile) oppure vetro, o addirittura altri materiali a seconda delle esigenze. Il corpo 2, su un primo lato 2a, alloggia: almeno una coppia di pozzetti 4 (preferibilmente, una pluralità di pozzetti 4); la regione di ingresso 30 formando un punto di ingresso per un fluido da alimentare ai pozzetti 4; il canale principale 6a connesso in modo fluidico alla regione di ingresso 30; e almeno una coppia di canali 6b secondari (preferibilmente una pluralità di coppie di canali 6b secondari), che collegano in modo fluidico il canale 6a principale al rispettivo pozzetto 4.

I pozzetti 4 si estendono all'interno del corpo 2 per la profondità D_W , il canale 6a principale si estende all'interno del corpo 2 per la profondità D_{MC} , i canali secondari 6b si estendono all'interno del corpo 2 per la profondità D_{CC} , in modo tale che

$D_W > D_{MC} > D_{CC}$. Esempi di valori delle profondità D_{MC} , D_{CC} , e D_W sono già stati riportati in precedenza.

Secondo la Figura 9, lo strato 14 flessibile è assente e il primo strato 12 biadesivo è a sua volta assente. Data la piccola dimensione dei canali 6 (nell'intervallo di micrometri), il flusso del liquido è guidato da un'azione capillare fino a che il liquido non entra nei pozzetti 4. I differenti valori delle profondità D_{MC} , D_{CC} , e D_W , e in particolare il fatto che $D_W > D_{MC} > D_{CC}$ dei canali 6b trasversali provveda al vantaggio che il fluido, una volta che è entrato in un certo pozzetto 4, non possa fuoriuscire dal rispettivo pozzetto 4 (il fluido è intrappolato all'interno di ciascuno dei pozzetti 4). In questo modo, una contaminazione incrociata tra pozzetti 4 è notevolmente ridotta, o addirittura eliminata, senza la presenza dello strato 14 flessibile avente le sporgenze 74.

Secondo un'ulteriore forma di realizzazione, il dispositivo microfluidico 1002 è munito dello strato 14 flessibile. Secondo questa forma di realizzazione, la possibilità della contaminazione incrociata tra pozzetti 4 è ulteriormente ridotta anche se il dispositivo microfluidico è mantenuto in una posizione capovolta oppure scosso.

Secondo un'ulteriore forma di realizzazione, il corpo 2 del dispositivo 1002 microfluidico è coperto con un cappuccio 8'. Il cappuccio 8' è configurato nello stesso modo del cappuccio 8 (cioè, è munito delle aperture 54) solo se è incluso uno strato 14 flessibile. Altrimenti, in assenza dello strato 14 flessibile, il cappuccio 8' è senza le aperture 54. Lo stesso insegnamento si applica allo strato 20' biadesivo (analogo al secondo strato 20 biadesivo ed avente la stessa funzione).

Secondo un'ulteriore forma di realizzazione, lo strato adesivo 20' non è presente, e il cappuccio 8' è accoppiato al corpo 2 per mezzo di una colla. Le scanalature 10 possono essere presenti, analogamente a quanto già descritto in riferimento alle Figure 3a e 3b.

Le Figure 10a, 10b mostrano una forma di realizzazione del corpo 2 ancora diversa. Secondo le Figure 10a, 10b, i pozzetti 4 sono organizzati come una serie ordinata, avente una o più file (lungo un asse X), oppure una o più colonne (lungo un asse Y). In una disposizione preferita, i pozzetti 4 sono sostanzialmente allineati in entrambi gli assi X e Y, sebbene ciò non sia essenziale e i pozzetti possono essere sfalsati su uno o più assi.

Tuttavia, i canali 6b trasversali che collegano un pozzetto alla sotto-diramazione 6a" non sono allineati uno rispetto all'altro lungo una stessa direzione parallela all'asse X. Invece, i canali trasversali 6b che si estendono su uno stesso lato della sotto-diramazione 6a" del canale principale 6a sono sfalsati rispetto ai canali trasversali 6b estendentisi sul lato opposto della stessa sotto-diramazione 6a" dello stesso canale 6a principale. In questo modo, la contaminazione incrociata tra pozzetti 4 è ulteriormente ridotta poiché il percorso fluidico da un pozzetto 4 a un altro pozzetto 4 attraverso i canali 6b è aumentato in lunghezza.

La forma di realizzazione delle Figure 10a, 10b può essere applicata al dispositivo 1000, 1001 microfluidico, cioè in combinazione con lo strato flessibile 14 provvisto di sporgenze 74, in modo da ridurre ulteriormente la contaminazione incrociata tra pozzetti 4. In questa situazione, secondo un aspetto, è prevista una sporgenza 74 per ciascun canale 6b trasversale.

Secondo un ulteriore aspetto, una sporgenza 74 può essere prevista per due canali 6b trasversali, sfalsati, purché i due canali 6b trasversali sfalsati siano sufficientemente vicini uno all'altro da permettere a una singola sporgenza 74 di entrare in

contatto con entrambi ed entrare, quando una pressione sufficiente è applicata sullo strato 14 flessibile, all'interno dei canali trasversali 6b sfalsati in modo da ostruire i canali trasversali sfalsati.

Secondo un altro aspetto, una sporgenza 74 può essere prevista per due canali 6b trasversali sfalsati, purché i due canali 6b trasversali sfalsati siano sufficientemente vicini uno all'altro in modo da consentire ad una singola sporgenza 74 di entrare in contatto con entrambi e, quando una pressione sufficiente è applicata sullo strato 14 flessibile, entrare all'interno dei canali trasversali 6b sfalsati in modo da ostruire i canali 6b trasversali sfalsati.

Risulta evidente che l'insegnamento della forma di realizzazione delle Figure 10a, 10b può essere applicato in generale a diverse configurazioni in cui le sottodiramazioni 6a'' e la diramazione principale 6a' coincidono (ad esempio, il canale principale comprende una diramazione singola, diritta come nella Figura 10a), oppure possono essere diramazioni separate (come in Figura 1a).

La Figura 11 mostra una ulteriore forma di realizzazione di un dispositivo 1003 microfluidico, secondo una vista prospettica, esplosa.

Il dispositivo 1003 microfluidico comprende un corpo 2 analogo al corpo 2 descritto in riferimento alle Figure 2a, 4a, 4b, oppure Figura 10a e pertanto indicato con lo stesso numero di riferimento.

Sopra la prima superficie 2a del corpo 2 è disposto uno strato 90 biadesivo. Lo strato 90 biadesivo comprende una pluralità di aperture formate completamente attraverso di esso, in modo analogo a quanto già descritto in riferimento al secondo strato 20 biadesivo. In dettaglio, un foro di ingresso 91 è formato attraverso lo strato 90 biadesivo e ha una forma circolare, oppure la forma scelta per la regione 30 di ingresso del corpo 2, oppure qualsiasi altra forma a seconda delle esigenze. Il foro di ingresso 91 è posizionato in modo tale che quando lo strato 90 biadesivo è disposto sopra il corpo 2, il foro di ingresso 91 sia sostanzialmente allineato, lungo l'asse Z, con la regione 30 di ingresso del corpo 2.

Lo strato 90 biadesivo comprende inoltre una pluralità di fori di sfiato 92 dell'aria, aventi una forma circolare (tuttavia altre forme, in generale poligonali, sono possibili). I fori 92 di sfiato dell'aria sono posizionati in modo tale che quando lo strato 90 biadesivo è disposto sopra il corpo 2, ciascun foro di sfiato dell'aria 92 sia disposto

sopra, e in collegamento fluidico con, una rispettiva regione 32 di uscita dell'aria.

Lo strato 90 biadesivo comprende inoltre una pluralità di fori 93 di valvola, aventi (da una vista dall'alto) una forma poligonale, per esempio una forma quadrata, oppure una forma circolare od ovale. Ciascun foro 93 di valvola è posizionato in modo tale che quando lo strato 90 biadesivo è disposto sopra il corpo 2, ciascun foro di valvola 93 sia disposto (quando considerato da una vista dall'alto) tra due pozzetti 4 rivolti verso una stessa sotto-direzionamento 6a", sopra una regione del corpo 2 che alloggia i due canali 6b trasversali direttamente accoppiati in modo fluidico ai pozzetti 4 summenzionati rivolti verso la stessa sotto-direzionamento 6a". Per riepilogare, quando lo strato 90 biadesivo è disposto come mostrato in Figura 11, il foro 91 di ingresso è sostanzialmente allineato con la regione 30 di ingresso, e i fori 92 di sfiato dell'aria sono sostanzialmente allineati con rispettive regioni 32 di uscita dell'aria.

Lo strato 90 biadesivo aderisce alla superficie 2a del corpo 2 nello stesso modo descritto in riferimento al secondo strato 20 biadesivo della Figura 2a.

Sopra lo strato 90 biadesivo si trova un cappuccio 94. Il cappuccio 94 è uno strato

flessibile, ad esempio realizzato in materiale elastomerico flessibile. Altri materiali possono essere utilizzati per il cappuccio 94, per esempio gli stessi materiali descritti per lo strato flessibile 14 (per esempio, PDMS o PMMA o silicone). Secondo una forma di realizzazione, il cappuccio 94 è realizzato in un materiale flessibile, biocompatibile.

Il cappuccio 94 aderisce allo strato 90 biadesivo. In questo modo, lo strato 90 biadesivo è disposto tra il cappuccio 94 e il corpo 2, e accoppia il cappuccio 94 al corpo 2.

Il cappuccio 94 è munito di sporgenze 95 (analoghe alle sporgenze 74 nelle figure 7a, 7b) configurate in modo da estendersi attraverso rispettivi fori 93 di valvola dello strato 90 biadesivo. Il cappuccio 94 ha uno spessore minimo (sporgenze 95 escluse) nell'ordine da 100 μm a 500 μm , per esempio circa 150 μm .

Secondo una forma di realizzazione, le sporgenze 95 hanno ciascuna uno spessore leggermente superiore rispetto allo spessore dello strato 90 biadesivo (per esempio pari allo spessore dello strato 90 biadesivo più la profondità D_{cc} dei canali trasversali 6b). Secondo un'altra forma di realizzazione, le sporgenze 95 hanno ciascuna uno spessore sostanzialmente uguale

allo spessore dello strato 90 biadesivo. In generale, le sporgenze 95 sono configurate in modo tale che, durante l'uso, quando una pressione sufficiente è applicata al cappuccio 94 lungo l'asse Z verso il corpo 2, le sporgenze 95 entrino nei canali 6b trasversali. Le sporgenze 95, pertanto, hanno la stessa funzione delle sporgenze 74 già descritte.

Il cappuccio 94 è inoltre munito di un foro 96 di ingresso formato in una regione del cappuccio 94, in modo tale che quando il cappuccio 94 è disposto sopra il corpo 2 e lo strato 90 biadesivo, il foro 96 di ingresso sia sostanzialmente allineato, lungo l'asse Z, con la regione 30 di ingresso del corpo 2 e il foro 91 di ingresso dello strato 90 biadesivo.

Il cappuccio 94 è inoltre munito di fori 97 di sfiato dell'aria, sostanzialmente allineati, quando il cappuccio 94 è disposto sopra il corpo 2 e lo strato 90 biadesivo, con i fori 92 di sfiato dell'aria dello strato 90 biadesivo.

Sopra il cappuccio 94 si trova un ulteriore strato 98 biadesivo. Sopra lo strato 98 biadesivo, si trova una membrana che è uguale alla membrana 16 già descritta (e pertanto indicata con lo stesso numero di riferimento), atta ad agire come separatore di gas/liquido. Lo strato 98 biadesivo funge da

interfaccia tra il cappuccio 94 e la membrana 16, per accoppiare il cappuccio 94 alla membrana 16.

Al fine di permettere che un flusso di aria passi attraverso la membrana, lo strato 98 biadesivo è munito di una pluralità di fori 99 di sfiato dell'aria, ciascuno dei quali essendo sostanzialmente allineato quando montato con i fori 97 di sfiato dell'aria (e pertanto, anche con i fori di sfiato dell'aria 92 e le regioni 32 di uscita dell'aria).

Lo strato 98 biadesivo non è necessario che sia munito di fori di valvola analoghi ai fori di valvola 93 dello strato 90 biadesivo. Secondo un aspetto della presente invenzione, lo strato 98 biadesivo ha la stessa forma già descritta per la membrana 16 (cioè, è munito di un numero di aperture 98' analoghe alle aperture 84 della membrana 16). Ciò è particolarmente utile quando il dispositivo 1003 microfluidico viene utilizzato per analisi biologiche basate su fluorescenza (come descritto più avanti). Infatti, lo strato adesivo può essere leggermente opaco, creando così una barriera (o una regione di diffusione) per la luce fornita ai pozzetti 4, e/o per la luce emessa dai pozzetti 4 durante l'analisi basata su fluorescenza.

Le Figure 12a e 12b mostrano una ulteriore forma di realizzazione di uno strato 90' biadesivo che

riduce l'interferenza dello strato biadesivo con la luce diretta verso, e proveniente da, i pozzetti 4.

In particolare, la Figura 12b è una vista ingrandita della porzione racchiusa nel cerchio della Figura 12a. Lo strato 90' biadesivo delle Figure 12a, 12b comprende le caratteristiche dello strato 90 biadesivo della Figura 11 e inoltre comprende aperture 101 configurate in modo da essere allineate, quando lo strato 90' biadesivo è disposto sopra il corpo 2 come mostrato nella Figura 11, con pozzetti 4 rispettivi. In particolare, ciascun pozzetto 4 è allineato, almeno parzialmente, lungo l'asse Z, con una rispettiva apertura 101. In questo modo, lo strato biadesivo 90' non interferisce con il percorso ottico verso e dai pozzetti 4.

Facoltativamente, lo strato 90' biadesivo comprende inoltre aperture 103 configurate in modo da essere allineate quando lo strato 90' biadesivo è disposto sopra il corpo 2 come mostrato nella Figura 11, con rispettive porzioni dei canali trasversali 6b, in particolare le porzioni dei canali trasversali direttamente rivolte ed entranti nei rispettivi pozzetti 4. In questo modo, anche porzioni dei canali 6b trasversali sono aperte. Questa caratteristica permette di evitare una possibile ostruzione dei

canali 6b trasversali mediante lo strato 90' biadesivo.

Secondo un'altra forma di realizzazione, mostrata nella Figura 13, un dispositivo 1005 microfluidico comprende un serbatoio 105, formato sul corpo 2. Il serbatoio 105 è formato disponendo una struttura 107 definente una struttura chiusa sul corpo 2, in modo tale da racchiudere la rete microfluidica (pozzetti e canali) formata nel corpo 2. La struttura 107 è costituita da materiale rigido (per esempio, PC, PMMA, PVC) oppure morbido (per esempio, PDMS), e accoppiata al corpo 2 per mezzo di colla, saldatura, morsetti o in altro modo. Secondo una forma di realizzazione, la colla è adesivo al silicone, che può essere erogato in modo preciso.

Come è visibile nella Figura 13, la struttura 107 è disposta sopra la regione di ingresso 30 del corpo 2 ed è munita di un foro di ingresso 109, che si estende attraverso la struttura 107 per il suo intero spessore lungo l'asse Z. Il foro di ingresso 109 può avere una forma che è scelta a seconda delle esigenze. In particolare, il foro di ingresso 109 è formato in modo da permettere un accesso fluidico alla regione di ingresso 30, in modo tale che, durante l'uso, un liquido possa essere iniettato nella regione 30 di ingresso attraverso il foro di

ingresso 109. Secondo una forma di realizzazione preferita, il foro di ingresso 109 ha un'area di base che è all'incirca uguale all'area coperta dalla regione di ingresso 30. Secondo un'altra forma di realizzazione, il foro di ingresso 109 ha un'area di base che è maggiore dell'area coperta dalla regione di ingresso 30, facilitando in questo modo l'accesso all'ingresso 30.

La Figura 14 mostra, in una vista dall'alto, una vista ingrandita di una porzione del corpo 2 e la struttura 107 disposta sopra il corpo 2, dove il foro di ingresso 109 e la regione di ingresso 30 sono visibili. Secondo la forma di realizzazione della Figura 14, il foro di ingresso 109 ha una base circolare e forma un serbatoio sagomato rotondo per contenere un liquido che deve essere alimentato alla regione 30 di ingresso. Per esempio, il foro di ingresso 109 della Figura 14 contiene alcune decine di microlitri, cioè, 30 μ l. Il diametro $d_{INGRESSO}$ della base del foro di ingresso 109 è scelto in base alle esigenze, per esempio nell'ordine da 1 a 10 mm, in particolare 1-2 mm.

La Figura 15 mostra, da una vista dall'alto, una vista ingrandita di una porzione del corpo 2 e la struttura 107 disposta sopra il corpo 2, dove il foro di ingresso 109 e la regione di ingresso 30 sono

visibili, secondo un'altra forma di realizzazione. Secondo la Figura 15, la base del foro di ingresso 109 ha una sagoma quadrangolare, in particolare rettangolare, con lati di uno o più millimetri, per esempio 1,5 mm x 10 mm.

Le forme di realizzazione delle Figure 13-15 forniscono un serbatoio (cioè, il foro di ingresso 109), che facilita l'operazione di fornire un campione liquido alla regione di ingresso 30 in modo da riempire i pozzetti 4 attraverso i canali 6.

In riferimento alla Figura 16, una volta che il campione di liquido è stato fornito ai pozzetti 4, viene versato un olio minerale o alimentato in un altro modo, sul corpo 2 all'interno della regione chiusa o camera chiusa definita dalla struttura 107. In questo modo, l'olio minerale copre completamente i pozzetti 4 e la rete 6 di canali, fungendo da barriera al vapore per impedire l'evaporazione e la condensazione interna dei pozzetti 4. Il tipo di olio minerale da utilizzare è scelto a seconda delle esigenze, per esempio, l'olio minerale può essere scelto di un tipo configurato in modo da agire come mezzo per facilitare il trasferimento termico tra i pozzetti 4.

Uno strato 115 di copertura trasparente può quindi essere disposto sopra la struttura 107 in modo

da proteggere l'olio minerale da perdite o fuoriuscite dal serbatoio chiuso definito dalla struttura 107.

Nelle Figure 13-16 abbiamo illustrato un singolo serbatoio per contenere olio su ciascun pozzetto. Tuttavia, è anche possibile suddividere la struttura 107 (non mostrata), in modo tale che ogni pozzetto 4 abbia la sua propria camera dell'olio su di esso, riducendo così al minimo la possibilità di contaminazione.

La Figura 17 mostra un porta-dispositivo 100, configurato in modo da supportare il dispositivo 1000, 1001, 1003 microfluidico (quando assemblato come mostrato, per esempio, nelle Figure 1b e 2b), oppure esercitare una pressione sullo strato 14 flessibile, in modo tale che le sporgenze 74 entrino in contatto con la prima superficie 2a del corpo 2 ed entrino all'interno dei canali trasversali 6b, fungendo così da pistoni e chiudendo i canali trasversali 6b. Le sporgenze 74, essendo formate di materiale elastomerico flessibile (per esempio, PDMS o gomma di silicone), sono deformabili in misura sufficiente da entrare nei canali trasversali 6b quando è applicata una pressione sufficiente.

Il porta-dispositivo 100 può anche essere utilizzato per supportare il dispositivo 1002

microfluidico poiché fornisce un modo pratico per favorire l'adesione degli strati impilati e manipolare con sicurezza il dispositivo 1002 microfluidico. Tuttavia, dato che il dispositivo microfluidico 1002 non comprende lo strato flessibile munito di sporgenze 74, il porta dispositivo 100 non è ottimale per supportare il dispositivo microfluidico 1002. Un ulteriore supporto del dispositivo, in particolare adatto per supportare il dispositivo microfluidico 1002, è mostrato nella Figura 20 e descritto più avanti.

Di seguito, l'utilizzo del supporto del dispositivo 100 sarà descritto con particolare riferimento alle forme di realizzazione del dispositivo microfluidico 1000, 1001, senza limitare l'uso del supporto del dispositivo a queste specifiche forme di realizzazione.

Il porta dispositivo 100 comprende una porzione di base 102 atta a sostenere il dispositivo 1000, 1001 microfluidico, e una porzione di copertura 104, atta ad accoppiarsi alla porzione 102 di base in modo tale che il dispositivo microfluidico 1000, 1001 sia interposto tra la porzione di base 102 e la porzione di copertura 104. A questo proposito, sono previsti elementi di accoppiamento 106 che possono essere

ganci di assemblaggio a scatto, a sbalzo, morsetti, viti o simili.

In una forma di realizzazione della presente invenzione, la porzione 104 di copertura è realizzata in materiale trasparente di plastica. In particolare, la porzione di copertura 104 è trasparente rispetto ad almeno una certa lunghezza d'onda (nell'intervallo a frequenza visibile o non visibile), anche più in particolare alla stessa lunghezza d'onda alla quale il primo strato 12 biadesivo, lo strato 14 flessibile e il secondo strato 20 biadesivo (quando presente) sono trasparenti. Secondo una forma di realizzazione della presente invenzione, il primo strato biadesivo 12, lo strato 14 flessibile, il secondo strato biadesivo 20 (quando presente), e la porzione di copertura 104 sono trasparenti ad una o più lunghezze d'onda nell'intervallo visibile.

La Figura 18 mostra la porzione di base 102. La porzione di base 102 comprende uno scomparto 110 atto a trattenere il dispositivo 1000, 1001 microfluidico. Lo scomparto 110 comprende un'apertura di alloggiamento 111 in un telaio 112, circostante almeno parzialmente l'apertura di alloggiamento 111. Il telaio 112 ha una sagoma a gradino o listello, in modo tale che una regione periferica del secondo lato 2b del corpo 2 si trovi in contatto con il telaio

112. Il dispositivo 1000, 1001 microfluidico è tale da essere sostenuto dal telaio 112. Quando il dispositivo microfluidico 1000, 1001 è collocato all'interno dello scomparto 110, sia la parte superiore, sia la parte inferiore del dispositivo microfluidico 1000, 1001 sono liberi per l'ispezione.

La porzione di base 102 comprende inoltre una porzione di manico 116, attraverso la quale un utente può manipolare il supporto del dispositivo 100.

La porzione di base 102 comprende inoltre una pluralità di aperture di accoppiamento 114 formata intorno all'apertura di alloggiamento 111 e il telaio 112. Le aperture di accoppiamento 114 sono fori passanti aventi (da una vista dall'alto) una forma poligonale, per esempio quadrangolare. Le aperture 114 di accoppiamento sono configurate in modo da essere accoppiate con ganci 124 della parte di copertura 104 del supporto del dispositivo 100.

La Figura 19 mostra in maggiore dettaglio una forma di realizzazione della porzione 104 di coperchio munita di ganci 124. I ganci 124 comprendono una base 124' sporgente dalla porzione di coperchio 104 lungo una direzione ortogonale rispetto alla superficie 104a della porzione di coperchio 104, e una porzione di bloccaggio 124'', estendentisi ad una distanza dalla superficie 104a, dalla base 124'

lungo una direzione parallela alla superficie 104a. Pertanto, il gancio 124 provvede ad un assemblaggio a scatto a sbalzo.

La porzione di copertura 104 e la porzione di base 102 sono accoppiate insieme, durante l'uso, inserendo i ganci 124 nelle aperture 114 di accoppiamento. La porzione di bloccaggio 124" di ciascun gancio 124 attraversa le aperture di accoppiamento 114, ma queste non possono essere rilasciate facilmente dalle aperture 114 di accoppiamento. In questo modo, la porzione del coperchio 104 è fissata alla porzione di base 102 del supporto del dispositivo 100, formando in questo modo gli elementi di accoppiamento 106 della Figura 17.

Inoltre, la porzione di copertura 104 ha la funzione di esercitare una pressione sullo strato flessibile 14 in modo tale che le sporgenze 74 chiudano i canali trasversali 6b. In questa misura, la porzione di copertura 104 alloggia una pluralità di protuberanze 126 in modo tale che, quando il dispositivo 1000, 1001 microfluidico è disposto nello scomparto 110 e la porzione di coperchio 104 è accoppiata alla porzione di base 102 (situazione mostrata nella Figura 17), ciascuna protuberanza 126 preme lo strato flessibile 14 in una regione dello strato flessibile 14 che corrisponde a una rispettiva

sporgenza 74. Lo spessore effettivo delle protuberanze 126 è scelto a seconda delle necessità, in modo tale che una pressione sufficiente sullo strato 14 flessibile sia applicata senza eccessiva deformazione dello strato 14 flessibile e/o del dispositivo 1000, 1001 microfluidico nell'insieme, che potrebbe danneggiare il dispositivo microfluidico 1000, 1001 o parti di esso.

Durante l'uso, un liquido viene alimentato alla regione 30 di ingresso del dispositivo 1000, 1001 microfluidico. Durante la fase di alimentazione del liquido, le sporgenze 74 non sono premute in modo da chiudere i canali trasversali 6b, in modo tale che il flusso del liquido non sia impedito dalle sporgenze 74 (cioè, il dispositivo 1000, 1001 microfluidico non è interposto tra la porzione 102 di base e la porzione di copertura 104). Come descritto in precedenza, il liquido entra nei pozzetti 4 attraverso la rete di canali 6. Una volta che i pozzetti 4 sono riempiti (parzialmente o completamente, a seconda delle necessità) dal liquido (per esempio, dopo un certo periodo di tempo), una pressione viene applicata allo strato 14 flessibile, per esempio utilizzando il supporto del dispositivo 100 delle Figure 17-19. I pozzetti 4, in questo modo,

sono isolati uno dall'altro e si evitano interferenze o contaminazioni incrociate.

La Figura 20 mostra un supporto 127 del dispositivo secondo un'ulteriore forma di realizzazione della presente invenzione. Il supporto 127 del dispositivo è particolarmente adatto a supportare il dispositivo microfluidico 1002 e/o il dispositivo microfluidico 1005. Il supporto del dispositivo 127 comprende uno scomparto 128 atto a supportare il dispositivo microfluidico 1002, 1005. Lo scomparto 128 comprende un'apertura di alloggiamento 128a e un telaio 128b, circondanti almeno parzialmente l'apertura di alloggiamento 128a. Il telaio 128b ha una forma a gradini, in modo tale che una regione periferica del secondo lato 2b del corpo 2 si trovi in contatto con il telaio 128b. Il dispositivo 1002, 1005 microfluidico è così sostenuto dal telaio 128b. Quando il dispositivo 1002, 1005 microfluidico è posizionato all'interno dello scomparto 128, sia la parte superiore sia la parte inferiore del dispositivo microfluidico 1002, 1005 sono aperte per l'ispezione. Il supporto 127 del dispositivo comprende inoltre una porzione di manico 129 con cui un utente può manipolare il supporto del dispositivo 127.

Le Figure 21-28 si riferiscono, in generale, ad uno qualsiasi dei dispositivi microfluidici precedentemente descritti in riferimento alle rispettive forme di realizzazione. In particolare, le Figure 21-28 sono relative ai dispositivi microfluidici 1000, 1001, 1002, 1003, 1005. Di seguito, si fa riferimento ad una o più di tali forme di realizzazione utilizzando il dispositivo 1000-1005 microfluidico della formulazione.

La Figura 21a mostra un dominio fluidico del dispositivo microfluidico 1000-1005, rappresentato da un modello pieno. L'area fluidica corrisponde al volume complementare della rete microfluidica di canali 6, pozzetti 4, regioni di uscita 32 e microcanali 5 di sfiato dell'aria.

Le Figure 21a e 22a mostrano un dominio fluido del dispositivo microfluidico 1000-1005, rappresentato da un modello pieno. Nei dettagli, il dominio fluidico della Figura 21a si riferisce ad un dispositivo microfluidico 1000-1005 comprendente un corpo 2 del tipo mostrato nelle Figure 3b e 4b; il dominio fluidico della Figura 22a si riferisce a un dispositivo microfluidico 1000-1005 comprendente un corpo 2 del tipo mostrato nelle Figure 10a, 10b.

Il dominio fluidico corrisponde al volume complementare della rete microfluidica di canali 6,

pozzetti 4, regioni di uscita 32 e microcanali 5 di sfiato dell'aria. Il volume liquido della regione di ingresso 30 è indicato nelle Figure 21a, 22a dal numero di riferimento 130; il volume liquido del canale principale 6a è indicato nella Figura 21a, 22a con il numero di riferimento 136a; il volume liquido dei canali 6b trasversali è indicato nelle Figure 21a, 22a con il numero di riferimento 136b; il volume liquido dei pozzetti 4 è indicato nella Figura 21a, 22a dal numero di riferimento 134; il volume liquido dei microcanali 5 di sfiato dell'aria e le regioni 32 di uscita dell'aria è indicato nelle Figure 21a, 22a dal numero di riferimento 138.

Per valutare il calo della pressione dovuto alla resistenza fluidica cui si oppone il riempimento di liquido dei canali 6, pozzetti 4 summenzionati, e microcanali di sfiato dell'aria, un modello semplificato del dominio fluido è considerato come mostrato nelle Figure 21b, 22b che mostrano una parte del dominio fluidico nelle Figure 21a e rispettivamente 22a.

Il dominio fluido semplificato delle Figure 21b, 22b comprende i volumi 134 di una coppia di pozzetti 4, i volumi 136b dei canali trasversali 6b relativi, i volumi 138 dei microcanali 5 dello sfiato dell'aria

e regioni di uscita dell'aria 32 e il volume 136a di un tronco del canale principale 6a.

Una discretizzazione del dominio fluido della Figura 21b, 22b in un modello di volume finito permette di calcolare una simulazione fluidica del dispositivo microfluidico 1000-1005, applicando condizioni al contorno. Le condizioni limite applicate al dominio fluido sono riepilogate di seguito.

Il liquido considerato ha le stesse proprietà dell'acqua a una temperatura ambiente di 25°C, e una pressione ambiente P_{amb} (cioè, $P_{amb} = 1 \text{ atm}$) durante il carico del campione sulla regione di ingresso 130. E' stata considerata una portata del campione di ingresso di circa 40 $\mu\text{l}/\text{min}$, corrispondente ad una velocità di ingresso nel canale principale 6a di 0,011 m/s. L'adesione del fluido alle pareti definenti il dominio fluidico è considerata imponendo tutti i componenti della velocità del fluido ad un valore pari a zero sulle pareti, che delimitano il dominio fluidico (nessuna condizione al contorno di impenetrabilità). Le condizioni di uscita dell'ambiente fluidodinamico sono ottenute applicando la pressione ambiente sulla membrana 16 del separatore gas/liquido.

Il calo della pressione calcolato attraverso simulazioni mostra che la distribuzione della pressione relativa all'interno del dispositivo 1000-1005 microfluidico varia da un valore massimo di circa $1,7 \cdot 10^3$ Pa sul canale principale 6a a un valore minimi di circa zero sui microcanali 5 di sfiato dell'aria (i valori dati si riferiscono alla pressione relativa, cioè la differenza tra pressione locale e pressione ambiente).

La pressione all'interno dei canali trasversali 6b è il massimo a cui i canali trasversali 6b si intersecano con il canale principale 6a ($1,7 \cdot 10^3$ Pa) e un minimo in cui i canali trasversali 6b si intersecano con i pozzetti 4 ($4,2 \cdot 10^2$ Pa). La pressione all'interno dei pozzetti 4 è di circa $4,2 \cdot 10^2$ Pa.

La simulazione ci permette di calcolare la sovrappressione (calo di pressione) dal valore atmosferico necessario per far fluire il liquido dalla regione di ingresso 30 ai microcanali 5 di sfiato dell'aria. Il valore di sovrappressione è dovuto a cali di pressione localizzati, generati dalla viscosità del fluido e dalle resistenze della pressione localizzate, dovute ad una variazione della sezione e variazioni del percorso fluidico (restrizioni e ingrandimenti).

Il calo di pressione massima è posizionato sui canali trasversali 6b in cui vi è una consistente riduzione della sezione del canale e, di conseguenza, il fluido aumenta la sua velocità e si verifica una perdita di pressione principale. La distribuzione della velocità del fluido all'interno del dominio fluidico delle Figure 21, 22 è massima sui canali 6b trasversali, dove vi è una riduzione della sezione del canale, e sui microcanali di sfiato dell'aria. Il totale calo di pressione necessario per riempire il sistema con il fluido (qui, come esposto, acqua) è stato simulato come a circa 20 mbar. La resistenza locale opposta al fluido durante il suo flusso nella rete dei canali 6 è trascurabile.

Il dispositivo microfluidico 1000-1005 è, secondo una forma di realizzazione della presente invenzione, una piattaforma per analisi del sangue basate sul DNA, ma può essere impiegato per qualsiasi saggio chimico, inclusi i saggi a base di anticorpi, saggi enzimatici, saggi chimici e simili.

Quale esempio, in analisi del sangue basate sul DNA, un campione contenente tipicamente globuli bianchi viene scomposto oppure lisato utilizzando mezzi chimici, termici o biochimici al fine di liberare il DNA da analizzare. Il DNA denaturato mediante processi termici, biochimici o chimici e

amplificato mediante una reazione di amplificazione, come PCR (reazione a catena della polimerasi), LCR (reazione a catena della ligasi), SDA (amplificazione per spostamento del filamento), TMA (amplificazione mediata da trascrizione), RCA (amplificazione a cerchio rotante), NASBA (amplificazione basata sulla sequenza degli acidi nucleici), e simili. La fase di amplificazione permette all'operatore di evitare la purificazione del DNA che viene studiato perché il prodotto amplificato aumenta notevolmente il DNA di partenza del campione.

Se l'RNA deve essere analizzato, le procedure sono simili, ma si mette più enfasi sulla purificazione o altri mezzi per proteggere la molecola di RNA labile. L'RNA è solitamente accoppiato nel DNA (cDNA) e quindi l'analisi procede come descritto per il DNA.

Il prodotto di amplificazione è soggetto a qualche tipo di analisi, solitamente basato sulla sequenza o dimensione o qualche combinazione di esso. In una analisi tramite ibridazione di microarray, per esempio il DNA amplificato, viene fatto passare su una pluralità di rivelatori costituiti da frammenti di rivelatori oligonucleotidici individuali che sono ancorati, per esempio, all'interno dei pozzetti 4 (che sono le camere di reazione) del dispositivo

microfluidico 1000-1005. Se i filamenti di DNA amplificati sono complementari ai rivelatori oligonucleotidici o sonde, si formeranno legami stabili tra loro (ibridazione) in condizioni di temperatura specifiche. I rivelatori ibridati possono essere letti tramite osservazione utilizzando un'ampia varietà di mezzi, inclusi i mezzi ottici, elettromagnetici, elettrochimici o termici.

Altre molecole biologiche sono analizzate in modo simile, ma tipicamente una purificazione delle molecole è sostituita con un'amplificazione, e i metodi di rilevamento variano a seconda della molecola che viene rivelata. Per esempio, una diagnostica comune comporta il rilevamento di una proteina specifica tramite legame al suo anticorpo. Una tale analisi richiede diversi gradi di separazione cellulare, lisi, purificazione e analisi di prodotti tramite legame degli anticorpi, che a sua volta può essere rivelata in un numero di modi. Lipidi, carboidrati, farmaci e piccole molecole di fluidi biologici sono trattati in modo simile. Tuttavia, per semplicità, la seguente discussione è focalizzata sull'analisi dell'acido nucleico, in particolare analisi del DNA, come esempio di una molecola biologica che può essere analizzata utilizzando i dispositivi della presente invenzione.

I dispositivi della presente invenzione permettono una analisi del DNA parallela e multiplex, comprendente saggi in tempo reale, che utilizzano, per esempio, quattro sonde di molecular beacon marcate con fluorofori di colore diverso in ciascun pozzetto. In questo modo, una serie $12 \times 8 = 96$ di pozzetti può rilevare ampliconi per 384 differenti sequenze target. Pertanto, un trattamento massiccio parallelo e multiplex è possibile sul piccolo dispositivo, eppure le contaminazioni incrociate sono state ridotte, se non eliminate, grazie al progetto impiegato qui.

Con riferimento alla Figura 23, un apparecchio di analisi biochimica 200 comprende un sistema di computer 202, un modulo di controllo della temperatura 203, e un dispositivo lettore 204.

Il dispositivo di analisi biochimica 200 è configurato in modo da interagire con il supporto del dispositivo 100, 127 munito del dispositivo microfluidico 1000, 1001, 1002, 1003, 1005, per svolgere analisi biochimiche. Di seguito, il supporto del dispositivo con il dispositivo microfluidico verrà denominato cartuccia 207, indipendentemente dalla particolare forma di realizzazione del supporto del dispositivo e/o dispositivo microfluidico. La cartuccia 207 può essere caricata in un ricettacolo

209 per l'accoppiamento con il modulo di controllo 203 della temperatura e il dispositivo lettore 204.

Il modulo di controllo 203 della temperatura e il dispositivo lettore 204 sono entrambi controllati da una unità di elaborazione 210 del sistema di computer 202. Il modulo di controllo 203 della temperatura comprende un controller della temperatura 211 e una sorgente di potenza 212. Il controller della temperatura 211 è configurato in modo da ricevere un segnale della temperatura da un sensore della temperatura (descritto in basso) formato integrato all'interno del dispositivo microfluidico 1000-1005, oppure generalmente accoppiato al dispositivo 1000-1005 microfluidico.

Il modulo di controllo 203 della temperatura può anche comprendere un elemento di raffreddamento 213, cioè, un modulo di Peltier oppure un ventilconvettore, che è controllato dal controller 211 della temperatura ed è accoppiato termicamente al dispositivo microfluidico 1000-1005 quando la cartuccia 207 è caricata nel ricettacolo 209.

La sorgente di potenza 212 e l'elemento di raffreddamento 213 sono attivabili mediante il controller della temperatura 211, rispettivamente, per erogare potenza al riscaldatore(i) (a sua volta descritto di seguito) formato integrale con il

dispositivo microfluidico 1000-1005, oppure accoppiato termicamente al dispositivo microfluidico 1000-1005, e per raffreddare il dispositivo 1000-1005 microfluidico al fine di impostare una temperatura di funzionamento secondo un profilo della temperatura (definito dal ciclo termico PCR scelto).

In una forma di realizzazione, il dispositivo lettore 204 è configurato in modo da svolgere un rilevamento ottico di prodotti di reazione nei pozzetti 4 del dispositivo 1000-1005 microfluidico, come descritto di seguito. In particolare, il dispositivo lettore 204 comprende una sorgente luminosa 215 per illuminare i pozzetti 4 del dispositivo microfluidico 1000-1005 con luce ad una lunghezza d'onda di eccitazione; e un rivelatore di immagini 216, configurato per ricevere radiazione di fluorescenza in essa dai pozzetti 4, in risposta alla luce e ad una o più lunghezze d'onda di eccitazione. A tale scopo, lo strato(i) disposto(i) sopra il corpo 2 (come descritto in precedenza) è/sono trasparenti sia alla lunghezza(e) d'onda di eccitazione sia alla lunghezza d'onda della radiazione di fluorescenza emessa.

Tuttavia, resta inteso che altri modi per svolgere il rilevamento sono disponibili nell'arte nota e possono essere usati, al posto del rilevamento

ottico. Per esempio, si può effettuare un rilevamento elettrochimico.

La Figura 24 illustra il corpo 2 da una vista dal basso (secondo lato 2b, opposto al primo lato 2a), che illustra in dettaglio una forma di realizzazione di un riscaldatore 220 integrato e che può essere utilizzato con uno qualsiasi dei dispositivi descritti qui.

Il riscaldatore 220 è formato sul secondo lato 2b del corpo 2 e forma un percorso termico, che si sviluppa sul secondo lato 2b del corpo 2. Secondo un'altra forma di realizzazione, non mostrata, il percorso termico si sviluppa (almeno parzialmente) all'interno del corpo 2.

Indipendentemente dalla forma di realizzazione del riscaldatore 220, il riscaldatore 220 comprende un percorso elettrico configurato in modo da generare calore tramite effetto Joule. Il percorso elettrico è formato da una striscia continua (costituita da un materiale come per esempio Al, AlCu, o altro materiale metallico, lega o materiale conduttivo), estendentesi da un primo percorso conduttivo 227 e a un secondo percorso conduttivo 222. Il percorso elettrico del riscaldatore 220 è formato in modo tale che tutti i pozzetti 4 siano riscaldati in maniera

uniforme alla temperatura(e) desiderata(e) durante l'uso.

Nella Figura 24, il percorso elettrico del riscaldatore 220 è mostrato estendentesi (quando osservato dal basso, lungo la direzione Z) sostanzialmente tra pozzetti 4 adiacenti lungo la direzione Y, solo parzialmente sovrapposti, lungo l'asse Z, con i pozzetti 4. Il riscaldatore 220 ha così la forma di un rastrello o pettine, che è nuovamente riflesso sul lato opposto.

Una sensore 223 della temperatura è formato allineato verticalmente (cioè, allineato lungo l'asse Z) con i pozzetti 4. Il sensore 223 della temperatura è formato mediante una pluralità di strisce che si estendono sul secondo lato 2b del corpo 2 da un terzo e un quarto cuscinetto 225, 226. Il sensore della temperatura 223 è disposto al disopra (o al disotto) del secondo lato 2b del corpo 2 sostanzialmente allineato, lungo l'asse Z, con i pozzetti 4. Il sensore della temperatura 223 si estende sul secondo lato 2b nelle regioni del secondo lato 2b non coperte dal riscaldatore 220. Il sensore della temperatura 223, che è di per sé noto, è costituito da materiali metallici con una resistenza elettrica superiore rispetto al riscaldatore, per esempio di due ordini di grandezza più resistente rispetto al riscaldatore.

Quando la cartuccia 207 è caricata nel ricettacolo 209 (Figura 23), il riscaldatore 220 è connesso, attraverso i cuscinetti 221, 222, alla sorgente di potenza 212 per ricevere potenza elettrica, e il sensore della temperatura 223 è connesso attraverso i cuscinetti 225, 226 all'unità di controller della temperatura 211 per fornire un segnale della temperatura indicativo della temperatura alla quale i pozzetti 4 sono scaldati/raffreddati.

Il modello/layout del riscaldatore 220 può essere ottimizzato secondo una particolare configurazione del dispositivo microfluidico 1000-1005 e disposizione dei pozzetti 4, al fine di conseguire i profili di temperatura desiderati. Il sensore di temperatura 223 è preferibilmente disposto sotto i pozzetti 4.

Il corpo 2 è costituito, secondo questa forma di realizzazione, di un materiale termicamente conduttivo, come per esempio silicio non drogato. In questo modo, il calore generato dal riscaldatore 220 è trasferito facilmente ai pozzetti 4 attraverso il corpo 2. La distanza verticale (misurata lungo l'asse Z) tra il riscaldatore 220 e il fondo dei pozzetti 4 varia tra 100 μm e 350 μm , per esempio pari a 300 μm .

Per l'utilizzo del dispositivo microfluidico 1000-1005 come microarray per analisi biochimiche, in

particolare per reazioni PCR, 230 sonde di DNA sono disposte all'interno dei pozzetti 4, come mostrato schematicamente nella Figura 25, che mostra una vista in sezione di un pozzetto 4. Secondo una forma di realizzazione, tutti i pozzetti 4 del dispositivo microfluidico 1000-1005 contengono sonde di DNA 230; secondo un'altra forma di realizzazione, solamente alcuni dei pozzetti 4 contengono sonde di DNA 230, e gli altri pozzetti sono per vari campioni di controllo. Le sonde 230 in un pozzetto 4 possono essere differenti dalle sonde 230 in un altro pozzetto 4, oppure possono essere utilizzate le stesse sonde 230 a seconda delle necessità.

Secondo una forma di realizzazione, la pluralità di sonde di acido nucleico 230 nei pozzetti 4 è costituita da deossiligonucleotidi a filamento singolo, innestati sul fondo dei pozzetti 4. Il fondo dei pozzetti 4 può essere stato trattato in modo tale che l'innesto di sonde 230 sia potenziato. Per esempio, come mostrato in Figura 25, uno strato di passivazione 237 può essere stato formato all'interno dei pozzetti 4.

Sonde 230 sono atte a ibridare con DNA target a una temperatura di ibridazione specifica quando una reazione, come per esempio un'amplificazione di acido nucleico, viene svolta nei pozzetti 4. Le sonde

possono essere tutte dello stesso tipo all'interno di un determinato pozzetto, oppure sonde diverse possono essere posate in punti indirizzabili come desiderato. In alternativa, un rilevamento può essere attraverso sonde molecular beacon, libere in soluzione, e pertanto il fondo del pozzetto 4 potrebbe non aver legato su di esso sonde.

Di seguito, si farà riferimento ad un processo di analisi dell'acido nucleico comprendente PCR. Come è noto, la PCR è un processo ciclico, che coinvolge una serie di reazioni mediate da enzimi, il cui risultato finale sono copie identiche dell'acido nucleico target. Un campione biologico grezzo è trattato in via preliminare mediante fasi convenzionali di separazione o purificazione cellulare e lisi cellulare. Quindi, il campione viene aggiunto ad una soluzione comprendente enzimi (tipicamente, una DNA polimerasi come TAQ), primer, i quattro nucleotidi (nell'insieme definiti dNTPs), cofattore, tampone e, per esempio, un colorante fluorescente in grado di legarsi al DNA a doppia elica. Tali coloranti comprendono, ma non si limitano, a coloranti di bisbenzimmide o derivati da indolo (Hoechst 33342, Hoechst 33258 e 4',6-diammidino-2-fenilindolo), colorante di fenantridinio (etidio bromuro e propidio ioduro) e coloranti di

cianina (PicoGreen, YOYO-1 ioduro, SYBR Green I e SYBR Gold). Il colorante fluorescente è preferibilmente selezionato dal gruppo di coloranti di cianina e, in un esempio, è SYBR Green I. Quale, esempio un complesso di colorante-DNA, che si forma durante il processo di amplificazione, adsorbe una radiazione visibile in modo selettivo intorno ad una lunghezza 488 nm (blu) ed emette una radiazione visibile con un massimo di emissione a 522 nm (verde).

In base alle sequenze delle sonde 230 dei primer, si determina una temperatura di ibridazione alla quale le sonde 230 ibridano in filamenti singoli di DNA target complementare, e una temperatura di riassociazione alla quale i primer si legano alle loro sequenze complementari e sul DNA target. Le sonde 230 e i primer possono essere selezionati in modo tale che le temperature di ibridazione e riassociazione siano diverse una dall'altra; in alternativa, le temperature di ibridazione e riassociazione possono essere selezionate in modo tale da essere all'incirca uguali.

Per avviare un processo di analisi che coinvolge le PCR, una soluzione 250, per esempio contenente cellule del sangue come descritto in precedenza, viene alimentata ai pozzetti 4 attraverso la regione

di ingresso 30 del dispositivo microfluidico 1000-1005. Una lisi cellulare e una preparazione cellulare in tampone PCR possono essere effettuate prima del carico del campione oppure può essere svolta a on-board per mezzo di trattamento chimico oppure azione fisica (per esempio, ultrasuoni, perline, ecc.).

Secondo una forma di realizzazione, la summenzionata operazione di alimentazione viene svolta prima di inserire il dispositivo microfluidico 1000-1005 nel supporto 100 del dispositivo, in modo tale che i canali trasversali 6b non siano chiusi dalle sporgenze 74, e i pozzetti 4 possano essere alimentati con la soluzione 250. Dopo la fase di alimentazione dei pozzetti 4 con la soluzione, il dispositivo microfluidico 1000-1005 è fissato all'interno del supporto 100 del dispositivo, come descritto in precedenza. Ciascun pozzetto 4 è, d'ora innanzi, completamente isolato dagli altri pozzetti 4 dello stesso dispositivo microfluidico 1000-1005.

L'amplificazione del DNA tramite PCR viene quindi svolta nei pozzetti 4. A tale scopo, il controller della temperatura 211 attiva la sorgente di potenza 212 e l'elemento di raffreddamento 213 per erogare in modo controllabile una potenza elettrica del riscaldatore 220 e controllare ciclicamente una temperatura di funzionamento della soluzione 250 nei

pozzetti 4 secondo un profilo di temperatura di amplificazione desiderato.

Un esempio di un profilo di temperatura di amplificazione per la temperatura di funzionamento durante un ciclo di amplificazione PCR è mostrato nella Figura 26. Cicli di amplificazione PCR sono svolti in modo iterativo fino a che una o più condizioni di arresto non sono soddisfatte. Per esempio, l'amplificazione del DNA è monitorata per ciascun ciclo di PCR. Quando il DNA si trova nella fase log lineare di amplificazione, la quantità di fluorescenza aumenta al disopra dello sfondo. Il punto al quale la fluorescenza diviene misurabile, può essere scelto come condizione di arresto (questo punto è anche denominato ciclo soglia o punto di intersezione).

In riferimento alla Figura 26, un DNA a doppio filamento viene dapprima denaturato ad una temperatura di denaturazione T_D , per esempio intorno a 95°C , per 10 s-60 s (intervallo ΔT_1 nella Figura 26, pari a 15 s nell'esempio mostrato). In questa fase, le eliche di DNA si separano in filamenti singoli.

Quindi, la temperatura della soluzione 250 viene abbassata (fase di raffreddamento) a una temperatura

di circa 50°C-70°C, per esempio 60°C (intervallo ΔT_2 in Figura 26).

Quindi, nell'intervallo ΔT_3 nella Figura 26 vi è una fase di riassociazione dei primer, che avviene a una temperatura T_A di circa 50°C a 70°C per 10 s - 70 s (60°C per 60 s nell'esempio mostrato). In questo stadio, primer che sono più numerosi delle sonde, competono efficacemente e si legano alle loro sequenze complementari nel DNA target galleggiante, permettendo così l'amplificazione delle sequenze target.

Durante l'intervallo ΔT_3 avviene quindi la fase di estensione (o allungamento) alla quale la DNA polimerasi estende i primer, aggiungendo nucleotidi che sono complementari al filamento target. La temperatura di estensione, come mostrato in questo esempio, è la stessa temperatura T_A della temperatura di riassociazione. Quindi, la temperatura viene portata a T_D e avviene una nuova fase di denaturazione. Il processo è ciclico e può comprendere da 10 a 30 cicli prima della fine.

Durante il ciclo termico summenzionato, DNA target può essere valutato in uno qualsiasi dei modi noti in tempo reale, incluso l'uso di coloranti intercalanti non specifici come per esempio EtBr, oppure con l'utilizzo di una serie ordinata di sonde

marcate, oppure con una delle sonde a doppia marcatura, come per esempio sonde beacon, scorpion o Taqman.

Durante ciascun ciclo della Figura 26, la velocità di raffreddamento è, per esempio, almeno 5-7°C/s, mentre la velocità di raffreddamento è, per esempio, maggiore di 10°C/s.

I cicli possono essere ripetuti fino a che non si sono prodotte copie sufficienti del DNA target, in modo che siano rilevabili. Il processo di amplificazione può quindi essere interrotto al rilevamento positivo del DNA target ricercato, oppure dopo un numero soglia di cicli, se il DNA target non è rilevato (è pertanto determinato che il campione di partenza non contenga DNA target).

Risulta evidente che possono essere utilizzati altri cicli termici, per esempio come descritto nella domanda di brevetto EP 2 382 324.

Simulazioni termiche sono state svolte per valutare la capacità del dispositivo microfluidico 1000-1005 di essere sottoposto a rampe termiche (si veda la Figura 26) necessarie per svolgere i cicli PCR, al fine di assicurare una distribuzione della temperatura accurata e uniforme all'interno dei pozzetti di reazione 4.

Simulazioni del metodo degli elementi finiti (FEM) sono state svolte. A tale scopo, la distribuzione della temperatura è simulata per una coppia di pozzetti 4 (si veda la Figura 28). Le dimensioni della porzione del dispositivo microfluidico 1000-1005, che sono state considerate per la simulazione (due pozzetti di reazione 4, un tronco del canale principale 6a, due canali 6b trasversali, e due microcanali di sfiato dell'aria) comprendono un'altezza lungo l'asse Z di 1,225 mm, una larghezza lungo l'asse Y di 1,4 mm, e una lunghezza lungo l'asse X di 4,6 mm. Le dimensioni di ciascun pozzetto 4, che sono state scelte per la simulazione comprendono una lunghezza laterale di 0,7 mm per un pozzetto quadrato, e una profondità di 0,35 mm.

Entrambe le simulazioni stazionarie e transitorie sono state svolte: le simulazioni stazionarie sono utili per valutare la prestazione termica assoluta del dispositivo microfluidico 1000-1005 in termini di accuratezza e uniformità, e le simulazioni transitorie sono utili per valutare la capacità del dispositivo microfluidico 1000-1005 di seguire una impostazione della temperatura dipendente dal tempo durante i cicli di PCR.

Si considera solamente la conduzione termica (nessuna avvezione del campo di temperatura mediante alcun flusso di fluido). Il che significa che l'equazione di regolazione è la seguente:

$$\frac{\partial T}{\partial t} = \vec{\nabla} \cdot (k \vec{\nabla} T)$$

dove k è la conduttività termica del materiale e T è la temperatura assoluta.

Il termine tempo dipendente svanisce quando le simulazioni stazionarie vengono svolte.

Le simulazioni sono state svolte considerando alcune ipotesi di base, in particolare: i pozzetti 4 sono completamente riempiti di acqua (cioè, assenza di bolle d'aria intrappolate all'interno dei pozzetti 4 e la rete di canali 6); solo una conduzione termica è considerata all'interno dei fluidi liquidi incorporati (cioè, flussi convettivi potenziali non sono presi in considerazione); solo una conduzione termica è considerata nei microcanali di sfiato dell'aria (cioè flussi convettivi potenziali non sono presi in considerazione); un flusso termico è solamente dovuto ad una convezione libera sul lato superiore del dispositivo microfluidico 1000-1005 (cioè, un flusso radiante, trascurabile nell'intervallo di temperatura studiato, non viene preso in considerazione); e il secondo lato 2b del

corpo 2 è condotto dalla temperatura (condizione al contorno di Dirichlet). Per simulazioni transitorie, si considera uno stato stazionario a 95°C come condizione iniziale.

Per eseguire le simulazioni, sono stati simulati alcuni cicli di temperatura. Per valutare in modo quantitativo il livello di prestazioni termiche del dispositivo microfluidico 1000-1005, si sono considerati tre diversi indicatori di emissioni. Sono stati valutati in modo sistemico su uno dei due pozzetti 4 della porzione simulata del dispositivo microfluidico 1000-1005.

Gli indicatori di emissione sono definiti come segue:

$$(1) \Delta T_{\max} = T_{\max} - T_{\min}$$

che indica la differenza di temperatura massima all'interno di un pozzetto di reazione (4);

$$(2) (1) \Delta T_{\text{media}} = \text{media}(T - T_{\text{impost}})$$

che indica la deviazione di temperatura rispetto all'impostazione della temperatura. È un'indicazione della compensazione che deve essere applicata per corrispondere all'impostazione della temperatura e alla temperatura media calcolata del pozzetto 4 considerato.

La prestazione termica del dispositivo microfluidico 1000-1005 è stata valutata a

temperature $T_{\text{impost}_1}=60^{\circ}\text{C}$ e $T_{\text{impost}_2}=95^{\circ}\text{C}$. Indipendentemente dall'impostazione della temperatura si è ottenuta una debole dispersione termica ($<0.2^{\circ}\text{C}$), confermando che, a uno stato stazionario, la temperatura necessaria è opportunamente impostata all'interno dei pozzetti di reazione 4.

Simulazioni sono svolte durante una pluralità di cicli PCR, secondo il profilo di temperatura della Figura 26, e sono riportate nella Figura 27 utilizzando la stessa scala temporale della Figura 26. La Figura 27 mostra curve di dispersione 300 (linea continua) e di sfalsamento 310 (linea tratteggiata) (si vedano gli indicatori di emissione definiti in precedenza ΔT_{max} e ΔT_{media}). I risultati mostrano che all'inizio di ciascuna rampa di impostazione, la dispersione e gli sfalsamenti sono soggetti a brevi valori superiori o inferiori a quelli previsti, il che è dovuto ad una omogeneizzazione numerica della rampa che rende i calcoli più grossolani e dev'essere considerata un artefatto.

Le simulazioni mostrano che con la costante di convezione a valori di default ($h=10 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{K}^{-1}$, dove h è la costante di convezione), il campo termico rientra nei valori richiesti ($\Delta T_{\text{max}}<0.25^{\circ}\text{C}$, dove ΔT_{max} è il gradiente della temperatura) indipendentemente

dall'impostazione di temperatura. In termini di prestazione transitoria, il tempo caratteristico è al disotto di 3,5 secondi, il che è abbastanza rapido rispetto alla durata del plateau di impostazione (15 sec, 60 sec a 95°C e 60°C rispettivamente). Per il valore h maggiore (cioè $h=10 \text{ W.m}^{-2}.\text{K}^{-1}$), il sistema dovrebbe essere al di fuori delle specifiche, visibilmente a $T_{\text{impost}}=65^\circ\text{C}$, ma una tale velocità di convezione libera è improbabile.

Inoltre, le prestazioni termiche del dispositivo microfluidico 1000-1005 sono state simulate quando il corpo 2 è sostituito con un corpo di plastica (in particolare, policarbonato), avente la stessa rete di canali 6 e pozzetti del corpo 2.

Le simulazioni mostrano che, date le proprietà isolanti della plastica, l'inerzia termica è maggiore, e rallenta notevolmente il tempo necessario per raggiungere il plateau.

Inoltre, la dispersione termica è superiore per il corpo di plastica rispetto al corpo di silicio (all'incirca cinque volte superiore ad una temperatura pari a 95°C). Pertanto, sebbene la plastica possa essere utilizzata per cartucce PCR monouso, materiali semiconduttori (per esempio, silicio) forniscono un tempo di risposta di gran lunga migliorato con una notevole precisione. Ciò

rende i materiali semiconduttori materiali preziosi per la fabbricazione, per esempio, dispositivi PCR multiplex con requisiti termici rigidi.

Con l'attuale progetto, la potenza tecnica necessaria per svolgere rampe precise (pendenza di 2.5°C/s) può essere stimata all'incirca intorno a 30 mW per la fase di riscaldamento e 25 mW per la fase di raffreddamento.

Risultati principali dello studio termico sono i seguenti: allo stato stazionario, il dispositivo microfluidico 1000-1005 munito di riscaldatori e sensori della temperatura integrato sul secondo lato 2b del corpo 2, e convezione libera sul lato superiore (attraverso i microcanali di sfiato dell'aria) soddisfa i requisiti termici predeterminati (per esempio, dispersione $< 0.25^{\circ}\text{C}$) all'interno di qualsiasi pozzetto 4 di reazione, indipendentemente dall'impostazione della temperatura.

Un corpo 2 a base di semiconduttori (in particolare, a base di silicio) permette al dispositivo microfluidico 1000-1005 di seguire quasi perfettamente le rampe termiche (fase di riscaldamento e raffreddamento). Il dispositivo microfluidico 1000-1005 raggiunge un plateau quasi istantaneamente.

Nella seguente discussione, saranno offerte prove che un dispositivo microfluidico in cui la profondità $D_W > D_{MC} > D_{CC}$ è efficace nella prevenzione della contaminazione incrociata tra pozzetti 4. Per fare questo, abbiamo simulato esperimenti PCR con una sonda con doppia marcatura, in cui il fluoroforo è rilasciato durante l'estensione, come per esempio una sonda Taqman. Come descritto, il dispositivo microfluidico secondo la presente invenzione comprende una pluralità di pozzetti 4 (che sono pozzetti di reazione quando viene utilizzata come cartuccia PCR, secondo una forma di realizzazione della presente invenzione). Ciascun pozzetto 4 può contenere un primer e una sonda specifici, posizionati nel pozzetto di reazione. Pertanto, ciascun pozzetto di reazione 4 può contenere un target differente, che può essere amplificato nello stesso momento del target di un altro pozzetto di reazione 4. Al momento iniziale, primer e sonde sono ben separati, ma durante il periodo di un esperimento PCR, possono essere trasportati da un pozzetto a un pozzetto vicino per effetto della diffusione molecolare. Probabilmente, una coppia sbagliata di primer e sonde in un dato pozzetto darà origine ad un segnale non specifico e quindi determinerà falsi risultati di quantificazione. Il dispositivo

microfluidico secondo la presente invenzione rende considerevolmente basso questo rischio.

La PCR candidata classicamente si affida a primer ben progettati, ma anche a sonde specifiche denominate reporter. Per produrre una unità di segnale, un primer e una sonda devono ibridare con un filamento stampo di DNA nello stesso ciclo termico. Quando in sospensione nel campione liquido, le sonde vengono spente ed effettivamente producono un segnale di fluorescenza molto basso. Quando partecipano ad una amplificazione, vengono digerite tramite Taq polimerasi durante il processo di allungamento e quindi vengono rilasciate molecole fluorescenti libere non spente. Ogni volta che sia il primer sia le sonde ibridano in un target per produrre un amplicone, una unità di fluorescenza viene definitivamente aggiunta al campione liquido. Il segnale di fluorescenza è monitorato attraverso lo strumento durante l'intero esperimento PCR.

Gli ampliconi sono il prodotto primario di una PCR. Di conseguenza, per prima cosa, ci focalizzeremo su quelle molecole di DNA per capire chiaramente i processi di base coinvolti nel processo di contaminazione. In un secondo tempo, osserveremo più da vicino la quantità di molecole fluorescenti che permettono allo strumento di monitorare la PCR. La

quantità di fluorofori liberi è effettivamente diversa dalla quantità di ampliconi prodotti durante la PCR perché i primer e le sonde non hanno né la stessa concentrazione iniziale né gli stessi coefficienti di diffusione. Lo scopo dello studio è valutare il rischio di una contaminazione di un pozzetto 4 tramite prodotti PCR specifici di un altro pozzetto 4. A tale scopo, quantità assolute oppure concentrazioni medie di ampliconi oppure fluorofori liberi saranno sistematicamente confrontate. Un livello di contaminazione mediante i fluorofori sarà a sua volta confrontato con un limite del sistema attuale di rilevamento per valutare se può essere rilevata o meno una contaminazione potenziale.

Sono stati utilizzati i seguenti parametri di riferimento. Ciascuna fase di diffusione è durata 89 secondi.

Sonde:

- Lunghezza sequenza: 15-20 basi
- Concentrazione iniziale: 250 nM
- Coefficiente di diffusione ($\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$): $1,6 \times 10^{-10}$

Primer:

- Lunghezza sequenza: 19-23 basi
- Concentrazione iniziale: 900 nM
- Coefficiente di diffusione ($\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$): $1,6 \times 10^{-10}$

Target:

- Lunghezza sequenza: 58 basi
 - Concentrazione iniziale: 1 $\rightarrow$ 1×10^5 copia/
pozzetto; $7.5 \times 10^{-6} \rightarrow 0.75$ nM
 - Coefficiente di diffusione ($\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$): $0,9 \times 10^{-10}$
- FAM:
- Lunghezza sequenze: 1 base + molecola FAM +
linker
 - Concentrazione iniziale: 0 nM
 - Coefficiente di diffusione ($\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$): $2,0 \times 10^{-10}$

Le Figure 29a, 29b mostrano i risultati dell'amplificazione simulati dopo 40 cicli con una concentrazione target iniziale sia bassa che elevata (rispettivamente, 1 e 1×10^5 copia per pozzetto). La resa dell'amplificazione è stata impostata a 1. In questo grafico, la quantità di ampliconi prodotti in entrambi i pozzetti è presentata come funzione del numero di cicli Ncicli.

Per tutto lo studio, i grafici saranno presentati nello stesso modo, in cui la curva a linea tratteggiata indica la quantità di molecole di interesse (DNA target oppure fluorofori liberi) contenuti in un pozzetto 4 dove primer e sonde sono stati precedentemente posizionati. Linee continue, invece, fanno riferimento alla quantità di molecole di interesse (DNA target oppure fluorofori liberi) in un pozzetto 4 adiacente dove erano inizialmente

contenuti solamente target. La linea tratteggiata, pertanto, indica il livello di contaminazione di questo pozzetto di controllo negativo.

In riferimento alla Figura 29a, il pozzetto di reazione 4 (curva tratteggiata) presenta una crescita esponenziale caratteristica (curva lineare nella scala logaritmica per l'asse y) prima della saturazione data la completa deplezione di primer (la concentrazione massima raggiunta è 880 nM che è quasi la concentrazione di primer iniziale).

La stessa velocità di amplificazione viene osservata nel pozzetto di controllo 4 (curva continua), ma con un ritardo di 6-7 cicli, il tempo necessario affinché il fluido fluisca dal pozzetto di reazione 4 al pozzetto di controllo 4 tramite diffusione. A circa 25 cicli, la velocità di crescita della curva continua diminuisce perché i primer contenuti nel pozzetto di reazione sono notevolmente ridotti. La bassissima velocità di aumento di target di DNA nel pozzetto di controllo 4 dopo questo 25-esimo ciclo, dimostra che il flusso di primer in entrata crolla. Forse, il segnale continua ad aumentare solamente per effetto della diffusione degli ampliconi contenuti nel canale microfluidico, che collega i due pozzetti.

Se ora ci concentriamo sulla curva di concentrazione target elevata (Figura 29b), i risultati sono uguali. Ma la quantità iniziale di target nel pozzetto di reazione 4 (curva tratteggiata) è talmente elevata che i primer sono ridotti in modo notevolmente più rapido. Di conseguenza, aumenta il ritardo affinché i primer raggiungano il pozzetto di controllo 4 in cui l'amplificazione PCR ha inizio al 20-esimo ciclo.

Nel caso di una resa di amplificazione più debole $r=0,9$, la situazione è la stessa sebbene la saturazione non sia raggiunta nel pozzetto di reazione 4 dopo 40 cicli con un carico target basso come illustrato nelle Figure 30a, 30b.

Risultati simulati dimostrano che, qualsiasi sia la velocità di resa r , la quantità di target nel pozzetto di reazione 4 (curva continua) dopo 40 cicli sia sempre uguale. In tutti i casi, il rapporto di ampliconi nel pozzetto di reazione 4 (curva tratteggiata) rispetto a quelli contenuti nel pozzetto di controllo 4 è estremamente elevato (20.000 nel peggiore dei casi). Questo significa che secondo esperimenti simulati, esiste una contaminazione, ma può essere irrilevabile rispetto alla quantità di ampliconi specifici persino con un carico target molto basso.

Secondo un'altra simulazione, un segnale di fluorescenza viene prodotto solamente se un primer e una sonda ibridano in un DNA filamento stampo nello stesso momento. La sonda summenzionata è, secondo una forma di realizzazione, una sonda Taqman. Poiché inizialmente vi sono meno sonde che primer, vi saranno effettivamente più ampliconi prodotti rispetto a fluorofori liberi rilasciati nella cartuccia al termine dell'esperimento PCR. Nello stesso modo dello studio sugli ampliconi, si analizza la quantità di fluorofori liberi rilasciati sia nei pozzetti di reazione (4) (curva tratteggiata) sia nei pozzetti di controllo (4) (curva continua) in funzione del numero di cicli PCR (Figure 31a, 31b). Ad una concentrazione target iniziale bassa (Figura 31a), si osserva lo stesso ritardo di 6-7 cicli tra i due pozzetti. Intorno al 25-esimo ciclo, la fase di crescita esponenziale si arresta e il segnale di fluorescenza aumenta principalmente per effetto della importante deplezione di primer nel pozzetto di reazione. Ad una concentrazione target iniziale elevata (Figura 31b), il comportamento della curva è quasi uguale ad eccezione del fatto che la velocità di crescita esponenziale diminuisce prima che con un carico target inferiore.

Su queste curve, il limite specifico attuale di rilevamento del sistema è indicato dalla linea CL. Come promemoria, lo scopo di questo studio era valutare il rischio di contaminazione del pozzetto di controllo mediante primer e sonde provenienti dal pozzetto di reazione adiacente e producenti un segnale di fluorescenza non specifico nel pozzetto di controllo. In altri termini, per essere sicuri che un segnale di contaminazione non sia rilevabile dal sistema, la curva continua deve rimanere al disotto della linea CL (e ovviamente quanto più al disotto, tanto è meglio). Si può osservare che questo è sempre vero e in tutti i casi con un buon margine. Un segnale di contaminazione potenziale è 20.000 volte inferiore rispetto al limite attuale di rilevamento del sistema ottico.

Come conclusione, qualsiasi sia la velocità di resa di amplificazione r , la contaminazione a fluorescenza si verifica, ma con un livello di fluorescenza associato di gran lunga al disotto del limite di rilevamento del sistema.

Si deve osservare che i risultati dati sono relativi ad un segnale di fluorescenza prodotto da un primer. Il protocollo PCR è effettivamente progettato con una coppia di primer specifici. In senso stretto, il livello di segnale simulato dovrebbe essere

moltiplicato per un fattore di due prima di essere confrontato con il limite di rilevamento del sistema. Ciononostante, la differenza tra la concentrazione dei fluorofori nei due pozzetti di reazione è talmente elevata che non influenza le conclusioni che il dispositivo microfluidico secondo la presente invenzione sia efficace nel ridurre considerevolmente la contaminazione incrociata tra pozzetti accoppiati in modo fluidico a uno stesso canale fluidico.

È possibile notare che i risultati delle Figure 29a-31b sono riferiti ad una geometria come data, per esempio, nella Figura 3b o 4b, laddove microcanali che collegano pozzetti di reazione al microcanale di carico principale vengono fuori "faccia a faccia". Considerando i primi risultati sia con gli ampliconi che con i fluorofori, possiamo aspettarci che l'aumento della lunghezza del percorso tra due pozzetti di reazione ridurrebbe il livello di contaminazione nel pozzetto 4 non funzionalizzato. Ciò può essere fatto, sfalsando i canali secondari 6b come mostrato, per esempio nelle Figure 10a, 10b.

Le Figure 32 e 33 mostrano i risultati simulati quando si prende in considerazione l'estensione di un percorso (per esempio, di circa 500 μm), sia per una concentrazione target iniziale bassa (figura 32) sia elevata (Figura 33). Poiché è necessario più tempo

affinché primer e sonde raggiungano il pozzetto di controllo 4, si ha l'aggiunta di un ritardo di 3-4 cicli tra geometria di riferimento e modificata. Di conseguenza, dato che la velocità di crescita esponenziale del pozzetto di controllo (curva continua) rimane all'incirca la stessa, la concentrazione di fluorofori liberi finale nel pozzetto di controllo, nel caso dei microcanali sfalsati, è minore di un fattore di tre.

Tutte le precedenti simulazioni sono basate sui coefficienti di diffusione di riferimento riportati sopra. Si analizza ora il caso in cui target, sonde o fluorofori liberi sono in grado di spostarsi più rapidamente attraverso i canali microfluidici. Dato che primer e sonde, da un lato, e fluorofori liberi dall'altro lato svolgono ruoli differenti in un processo PCR, i primi servono ad amplificare i target quando i secondi fungono da trasduttori di segnale), le sensibilità del modello verso coefficienti di diffusione molecolare superiori sono studiate separatamente.

Se coefficienti D di diffusione molecolare vengono moltiplicati per un fattore di 10, ma altri parametri di simulazione restano immutati, il comportamento del sistema è alquanto diverso rispetto al caso di riferimento analizzato in precedenza.

Risultati simulati per una quantità di fluorofori liberi sia nei pozzetti 4 di reazione sia di controllo sono mostrati nella Figura 34a (concentrazione target iniziale bassa) e Figura 34b (concentrazione target iniziale alta). La curva tratteggiata si riferisce al pozzetto di reazione 4; la curva continua si riferisce al pozzetto di controllo 4.

A una concentrazione bassa (Figura 34a), poiché i primer e le sonde possono diffondersi molto rapidamente attraverso la rete microfluidica, la crescita esponenziale inizia nello stesso momento nelle due camere di reazione. Ciononostante, la PCR è privilegiata nel pozzetto di reazione 4 (curva tratteggiata) poiché primer e sonde sono stati posizionati lì. In qualche momento, all'incirca al 23-esimo ciclo, i primer iniziano a essere limitati nel pozzetto di controllo 4 (curva continua) e la velocità di rilascio di fluorofori liberi nel pozzetto di controllo cala improvvisamente.

Ad una concentrazione target iniziale elevata (sulla destra), la forma della curva nel pozzetto di controllo 4 è simile con velocità di diffusione inferiori, ma la fluorescenza aumenta più rapidamente che nel caso di riferimento di canali 6b secondari non sfalsati.

Se il coefficiente D di diffusione molecolare di fluorofori liberi è modificato, il segnale di fluorescenza nel pozzetto 4 di controllo al termine dei 40 cicli termici aumenta (grafico non mostrato), ma con un livello restante ben al disotto del limite di rilevamento del sistema. Infatti, il peggiore dei casi offre un livello di fluorescenza di 0,13 nM che dev'essere confrontato con il limite di rilevamento di 40 nM.

Queste simulazioni mostrano che il modello è sensibile a parametri di ingresso delle velocità di diffusione. Tuttavia, si deve osservare che la contaminazione a fluorescenza tramite diffusione di sonde, primer e fluorofori certamente non supererà mai il limite di rilevamento del sistema.

Da un esame delle caratteristiche fornite secondo la presente invenzione emergono chiaramente ulteriori vantaggi.

Il dispositivo microfluidico secondo la presente invenzione ha costi limitati e pertanto trova applicazione come dispositivo monouso.

La pluralità di pozzetti di reazione (cioè 96 pozzetti), ciascuno di essi in grado di accumulare, secondo una forma di realizzazione, un volume liquido da 200 a 300 nl, permette all'utente di svolgere una pluralità di analisi biologiche nello stesso momento.

Inoltre, dato che secondo una forma di realizzazione il materiale (cioè silicio) in cui i pozzetti sono formati è termicamente conduttivo, una pluralità di cicli termici può essere condotta secondo una particolare necessità.

Il dispositivo fluidico della presente invenzione può essere prodotto utilizzando un trattamento e una tecnologia MEMS standard (ad esempio, litografia e attacco chimico). Pertanto, i costi di fabbricazione sono ridotti.

Inoltre, il dispositivo fluidico è munito, secondo una forma di realizzazione, di un riscaldatore e un sensore della temperatura, entrambi distribuiti sulla superficie opposta a quella dei pozzetti, in modo da assicurare un riscaldamento uniforme di tutti i pozzetti con differenze di temperatura al disotto di 1°C, con e senza il campione e i prodotti di reazione.

Infine, risulta chiaro che modifiche e varianti possono essere apportate alle forme di realizzazione descritte e illustrate nel presente, senza in questo modo allontanarsi dalla portata della presente invenzione, come definita nelle rivendicazioni allegate.

Per esempio, la regione 32 di uscita dell'aria può essere omessa ed invece ciascun canale di sfiato

dell'aria può essere formato verticalmente allineato (lungo l'asse Z) con una porzione di un rispettivo pozzetto 4.

Secondo una ulteriore forma di realizzazione, lo strato biadesivo 90' delle Figure 12a, 12b può essere utilizzato in una qualsiasi delle forme di realizzazione del dispositivo microfluidico precedentemente descritto, in particolare dispositivo microfluidico 1000, 1001, 1002, per sostituire lo strato biadesivo 12 e/o 20 e/o 20'.

Inoltre, la disposizione di pozzetti, canali, riscaldatori e sensore può essere modificata secondo le esigenze, seguendo i principi di progettazione descritti qui. Inoltre, la forma e la dimensione di qualsiasi apertura può essere modificata come necessario.

RIVENDICAZIONI

1. Dispositivo (1000-1005) microfluidico, comprendente:

un corpo (2) avente un primo lato (2a) e un secondo lato (2b) opposti uno all'altro, detto primo lato (2a) avendo:

almeno una coppia di pozzetti (4);

una regione di ingresso (30) formante un punto di ingresso per un fluido da alimentare ai pozzetti (4);

un canale principale (6a) connesso in modo fluidico alla regione di ingresso (30); e

almeno una coppia di canali secondari (6b), ciascuno dei canali secondari collegando fluidicamente il canale principale (6a) a un rispettivo pozzetto (4);

in cui i pozzetti (4) si estendono all'interno del corpo (2) per una prima profondità (D_W), il canale principale (6a) si estende all'interno del corpo (2) per una seconda profondità (D_{MC}), i canali secondari (6b) si estendono all'interno del corpo (2) per una terza profondità (D_{CC}), la prima profondità (D_W) essendo maggiore della seconda profondità (D_{MC}), e la seconda profondità (D_{MC}) essendo maggiore della terza profondità (D_{CC}).

2. Dispositivo microfluidico secondo la rivendicazione 1, in cui i canali secondari (6b) sono accoppiati a lati opposti del canale principale (6a) e sono sfalsati uno rispetto all'altro.

3. Dispositivo microfluidico secondo la rivendicazione 1 o 2, in cui il canale principale (6a) e i canali secondari (6b) sono configurati in modo tale che detto fluido sia condotto all'interno del canale principale e i canali secondari mediante azione capillare.

4. Dispositivo microfluidico secondo una qualsiasi delle precedenti rivendicazioni, comprendente inoltre uno strato (14) flessibile, disposto sopra il primo lato (2a) del corpo (2) e munito di almeno una sporgenza (74) che si estende verso il primo lato (2a) del corpo (2) e sovrapponesi, almeno parzialmente, ai canali secondari (6b), lo strato (14) flessibile essendo configurato in modo tale che quando una pressione è applicata su di esso, la sporgenza (74) entri in contatto con il primo lato (2a) del corpo (2) ed entri all'interno di almeno uno dei canali (6b) secondari, isolando così in modo fluidico un pozzetto (4) dall'altro pozzetto (4).

5. Dispositivo microfluidico secondo una qualsiasi delle precedenti rivendicazioni, comprendente inoltre uno strato di copertura (8) disposto sopra il primo lato (2a) del corpo (2) è configurato per chiudere a tenuta i pozzetti (4).

6. Dispositivo microfluidico secondo le rivendicazioni 4 e 5, in cui lo strato flessibile (14) è disposto sopra lo strato di copertura (8), lo strato di copertura essendo munito di almeno un primo foro (54) di valvola, che si estende attraverso lo strato (8) di copertura e si sovrappone, almeno parzialmente, ai canali secondari (6b), la sporgenza (74) estendendosi attraverso il primo foro (54) di valvola.

7. Dispositivo microfluidico secondo una qualsiasi delle precedenti rivendicazioni, comprendente inoltre una pluralità di canali (5) di sfiato dell'aria, ciascuno di essi essendo accoppiato in modo fluidico a un rispettivo pozzetto (4), e configurato in modo tale che quando il fluido è fornito ai pozzetti (4), un gas intrappolato all'interno dei pozzetti (4) possa fuoriuscire dai pozzetti (4) attraverso i canali (5) di sfiato dell'aria.

8. Dispositivo microfluidico secondo la rivendicazione 7, quando dipendente dalla rivendicazione 5, in cui i canali (5) di sfiato dell'aria si estendono attraverso lo strato (8) di copertura, il dispositivo (1000-1003) microfluidico comprendendo inoltre uno strato (16) a membrana disposto sopra lo strato di copertura (8) in modo da coprire i canali (5) di sfiato dell'aria e configurato in modo da essere impermeabile a detto fluido e permeabile a detto gas.

9. Dispositivo microfluidico secondo la rivendicazione 8, in cui i canali (5) di sfiato dell'aria si estendono inoltre attraverso lo strato (14) flessibile, e in cui lo strato (16) a membrana è disposto sopra lo strato (14) flessibile.

10. Dispositivo microfluidico secondo una qualsiasi delle precedenti rivendicazioni, in cui la regione (30) di ingresso è accessibile attraverso una pipetta o micro pipetta per fornire detto fluido.

11. Dispositivo microfluidico secondo la rivendicazione 5 o una qualsiasi delle rivendicazioni 6-10 quando dipendenti dalla rivendicazione 5, in cui il corpo (2) alloggia una o più scanalature (10), che si estendono sul primo lato (2a) almeno parzialmente intorno ad uno o più dei pozzetti (4), lo strato di

copertura (8) essendo chiuso a tenuta verso il corpo (2) per mezzo di una colla che si estende all'interno di dette scanalature (10).

12. Dispositivo microfluidico secondo la rivendicazione 11, in cui la colla è una colla biocompatibile, non fluorescente.

13. Dispositivo microfluidico secondo la rivendicazione 5 o una qualsiasi delle rivendicazioni 6-10 quando dipendenti dalla rivendicazione 5, comprendente inoltre un primo strato (20) biadesivo disposto tra il corpo (2) e lo strato di copertura (8), configurato in modo da accoppiare lo strato di copertura (8) al corpo (2).

14. Dispositivo microfluidico secondo la rivendicazione 13, in cui il primo strato (20) biadesivo è munito di almeno una coppia di fori (101) di ispezione, estendentesi attraverso un primo strato (20) biadesivo per il suo intero spessore, almeno parzialmente allineati con un pozzetto (4) rispettivo.

15. Dispositivo microfluidico secondo una qualsiasi delle precedenti rivendicazioni, comprendente inoltre un riscaldatore (220) integrato, formato sul secondo lato (2b) del corpo (2).

16. Dispositivo microfluidico secondo una qualsiasi delle precedenti rivendicazioni, comprendente inoltre un sensore (223) della temperatura integrato formato sul secondo lato (2b) del corpo (2).

17. Dispositivo microfluidico secondo una qualsiasi delle precedenti rivendicazioni, formante un micro reattore, in cui ciascun pozzetto (4) forma camere di reazione, e alloggia una serie ordinata di sonde (230) di acido nucleico in rispettive posizioni, per ibridare con i rispettivi acidi nucleici target; e in cui detto fluido è una soluzione (250) contenente primer, in grado di legarsi ad acidi nucleici target, nucleotidi, enzimi che estendono l'acido nucleico e acidi nucleici.

18. Dispositivo microfluidico secondo la rivendicazione 17 quando dipendente dalla rivendicazione 4, in cui lo strato flessibile (14) è trasparente ad almeno una prima e una seconda lunghezza d'onda, differenti una dall'altra.

19. Dispositivo microfluidico secondo la rivendicazione 17 oppure 18 quando dipendente dalla rivendicazione 5, in cui lo strato (8) di copertura è trasparente ad almeno una prima e una seconda lunghezza d'onda, differenti una dall'altra.

20. Dispositivo microfluidico secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-3, comprendente inoltre una struttura circostante (107) avente pareti laterali disposte sul primo lato (2a) del corpo (2) in modo da racchiudere completamente i pozzetti (4), detta struttura (107) circostante essendo ulteriormente provvista di un serbatoio (109) accoppiato in modo fluidico alla regione (30) di ingresso e configurato per contenere una quantità di detto liquido superiore rispetto alla quantità di detto liquido, che può essere contenuta dalla regione di ingresso (30).

21. Dispositivo microfluidico comprendente:

- un corpo (2) avente un primo lato (2a) e un secondo lato (2b) opposti uno all'altro, detto primo lato (2a) avendo:

- almeno una coppia di pozzetti (4); una regione di ingresso (30) formante un punto di entrata per un fluido che deve essere fornito ai pozzetti (4); un canale principale (6a) connesso in modo fluidico alla regione (30) di ingresso; e almeno una coppia di canali secondari (6b) che collega in modo fluidico il canale principale (6a) a un rispettivo pozzetto (4);

- strato di copertura (8), disposto al disopra del primo lato (2a) del corpo (2), configurato per

chiudere a tenuta i pozzetti (4) e provvisto di almeno un primo foro (54) di valvola, che si estende attraverso lo strato di copertura (8) e si sovrappone, almeno parzialmente, ai canali (6b) secondari;

- uno strato flessibile (14), disposto sopra lo strato di copertura (8) e munito di almeno una sporgenza (74) che si estende attraverso il primo foro (54) di valvola verso il corpo (2) e si sovrappone, almeno parzialmente, ai canali (6b) secondari, lo strato (14) flessibile essendo configurato in modo tale che quando una pressione viene applicata su di esso, la sporgenza (74) entra in contatto con il corpo (2) ed entri all'interno di almeno uno dei canali (6b) secondari, isolando così in modo fluidico un pozzetto (4) dall'altro pozzetto (4).

22. Cartuccia (207) comprendente:

- un dispositivo microfluidico (1000-1003) secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-20 oppure rivendicazione 21; e

- un supporto (100) di dispositivo configurato in modo da alloggiare detto dispositivo (1000-1003) microfluidico, comprendente una porzione di base (102) e una porzione di copertura (104) configurate

in modo da essere accoppiate una all'altra in modo tale che una pressione sia esercitata sul dispositivo microfluidico lungo una direzione parallela alla direzione di estensione della sporgenza (74), in modo tale che la sporgenza (74) entri in contatto con il corpo (2) ed entri all'interno di almeno uno dei canali (6b) secondari, isolando così in modo fluidico un pozzetto (4) dall'altro pozzetto (4).

23. Apparecchio per svolgere una amplificazione di acido nucleico, comprendente un dispositivo (1000-1005) microfluidico secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-20 o rivendicazione 21, oppure una cartuccia (207) secondo la rivendicazione 22.

24. Apparecchio secondo la rivendicazione 23, comprendente un modulo (203, 211) di controllo della temperatura per controllare ciclicamente una temperatura operativa della soluzione (250) secondo un profilo della temperatura.

25. Apparecchio secondo la rivendicazione 23 o 24, comprendente un dispositivo lettore (204) e in cui il dispositivo (1000-1005) microfluidico è montato su una tavoletta (209) per formare una cartuccia caricabile nel dispositivo lettore (204).

26. Apparecchio secondo la rivendicazione 25, in cui il dispositivo lettore (204) è un lettore ottico e comprende:

- una sorgente luminosa (215) per illuminare il dispositivo microfluidico (1000-1005) con luce alla prima lunghezza d'onda; e

- un rilevatore di immagini (204), configurato in modo da ricevere una radiazione di fluorescenza sulla seconda lunghezza d'onda emessa dal dispositivo microfluidico in risposta alla luce alla prima lunghezza d'onda.

27. Metodo di fabbricazione di un dispositivo (1000-1005) microfluidico, comprendente le fasi di prevedere un corpo (2) avente un primo lato (2a) e un secondo lato (2b) opposti uno all'altro; e formare, rivolte verso il primo lato (2a) del corpo (2) ed estendentisi all'interno del corpo (2):

- almeno una coppia di pozzetti (4) aventi una prima profondità (D_W);

- una regione di ingresso (30) che è un punto di ingresso per un fluido da fornire ai pozzetti (4);

- un canale principale (6a), connesso in modo fluidico alla regione di ingresso (30), e avente una seconda profondità (D_{MC}); e

almeno una coppia di canali (6b) secondari che collega in modo fluidico il canale principale (6a) a un rispettivo pozzetto (4) e avente una terza profondità (D_{CC}),

in cui la prima profondità (D_W) è maggiore della seconda profondità (D_{MC}), e la seconda profondità (D_{MC}) è maggiore della terza profondità (D_{CC}).

28. Metodo di fabbricazione secondo la rivendicazione 27, comprendente inoltre:

- disporre uno strato di copertura (8) sopra il primo lato (2a) del corpo (2), in modo da chiudere a tenuta i pozzetti (4), lo strato di copertura (8) essendo munito di almeno un primo foro (54) di valvola, che si estende attraverso lo strato (8) di copertura e si sovrappone, almeno parzialmente, ai canali secondari (6b); e

- disporre uno strato (14) flessibile sopra lo strato di copertura (8), lo strato (14) flessibile essendo munito di almeno una sporgenza (74) che si estende attraverso il primo foro di valvola verso il corpo (2) e si sovrappone, almeno parzialmente, ai canali (6b) secondari.

29. Metodo di fabbricazione di un dispositivo microfluidico, comprendente:

- prevedere un corpo (2) avente un primo lato (2a) e un secondo lato (2b) opposti uno all'altro;

- formare, sul primo lato (2a) del corpo (2), almeno una coppia di pozzetti (4), una regione (30) di ingresso che è un punto di ingresso per un fluido che dev'essere fornito ai pozzetti (4); un canale (6a) principale connesso in modo fluidico alla regione di ingresso (30), e almeno una coppia di canali secondari (6b) che connette in modo fluidico il canale principale (6a) a un rispettivo pozzetto (4);

- disporre uno strato di copertura (8) sopra il primo lato (2a) del corpo (2) in modo da sigillare i pozzetti (4), lo strato di copertura (8) essendo munito di almeno un primo foro (54) di valvola che si estende attraverso lo strato (8) di copertura e si sovrappone almeno parzialmente ai canali secondari (6b);

- disporre uno strato (14) flessibile sopra lo strato di copertura (8), lo strato (14) flessibile essendo provvisto di almeno una sporgenza (74) che si estende attraverso il primo foro di valvola verso il corpo (2) e si sovrappone, almeno parzialmente, ai canali secondari (6b):

30. Metodo per far funzionare il dispositivo microfluidico della rivendicazione 4 o il dispositivo microfluidico della rivendicazione 21, comprendente:

- alimentare una soluzione di liquido sulla regione di ingresso (30); e

- dopo la fase di alimentazione, applicare una pressione sullo strato (14) flessibile in modo tale che la sporgenza (74) entri in contatto con il corpo (2) ed entri all'interno di almeno uno dei canali (6b) secondari, isolando così in modo fluidico un pozzetto (4) dall'altro pozzetto (4).

31. Metodo per svolgere un'analisi chimica, detto metodo comprendendo: applicare un campione alla regione di ingresso di qualsiasi dispositivo microfluidico delle rivendicazioni 1-21, inserire detto dispositivo microfluidico in un dispositivo lettore, attivare detto dispositivo lettore e ottenere un risultato di un'analisi chimica.

32. Metodo secondo la rivendicazione 31, in cui detta analisi chimica è una amplificazione di DNA e un rilevamento dello stesso, e detto campione è un fluido biologico.

33. Metodo secondo la rivendicazione 31, in cui detta analisi chimica è una reazione di legame

anticorpo-antigene e un rilevamento della stessa, e detto campione è un fluido biologico.

34. Metodo secondo la rivendicazione 31, in cui detta analisi chimica è una reazione enzimatica e un rilevamento della stessa, e detto campione è un fluido biologico.

p.i.: 1) STMICROELECTRONICS S.R.L.

2) BIOMERIEUX S.A.

Simone BERTOLOTTO

CLAIMS

1. A microfluidic device (1000-1005), comprising:

a body (2) having a first side (2a) and a second side (2b) opposite to one another, said first side (2a) having:

at least a couple of wells (4);

an inlet region (30) forming an entrance point for a fluid to be supplied to the wells (4);

a main channel (6a) fluidically connected to the inlet region (30); and

at least a couple of secondary channels (6b), each of the secondary channels fluidically connecting the main channel (6a) to one respective well (4),

wherein the wells (4) extend within the body (2) for a first depth (D_W), the main channel (6a) extends within the body (2) for a second depth (D_{MC}), the secondary channels (6b) extend within the body (2) for a third depth (D_{CC}), the first depth (D_W) being greater than the second depth (D_{MC}), and the second depth (D_{MC}) being greater than the third depth (D_{CC}).

2. The microfluidic device according to claim 1, wherein the secondary channels (6b) are coupled to opposite sides of the main channel (6a) and are staggered with respect to one another.

3. The microfluidic device according to claim 1 or 2, wherein the main channel (6a) and the secondary channels (6b) are configured such that said fluid is driven within the main channel and the secondary channels by capillary action.

4. The microfluidic device according to any one of the preceding claims, further comprising a flexible layer (14), arranged above the first side (2a) of the body (2) and provided with at least a protrusion (74) extending towards the first side (2a) of the body (2) and overlapping, at least partially, the secondary channels (6b), the flexible layer (14) being configured such that, when a pressure is applied on it, the protrusion (74) contacts the first side (2a) of the body (2) and enters within at least one of the secondary channels (6b), thus fluidically isolating one well (4) from the other well (4).

5. The microfluidic device according to any one of the preceding claims, further comprising a cover layer (8), arranged above the first side (2a) of the body (2) and configured for sealing the wells (4).

6. The microfluidic device according to claims 4 and 5, wherein the flexible layer (14) is arranged above the cover layer (8), the cover layer being provided with at least a first valve hole (54) which extends through the cover layer (8) and overlaps, at least partially, the

secondary channels (6b), the protrusion (74) extending through the first valve hole (54).

7. The microfluidic device according to any one of the preceding claims, further comprising a plurality of air exhaust channels (5), each of them being fluidically coupled to a respective well (4), and configured such that, when the fluid is supplied to the wells (4), a gas trapped within the wells (4) can escape from the wells (4) through the air exhaust channels (5).

8. The microfluidic device according to claim 7 when depending on claim 5, wherein the air exhaust channels (5) extend through the cover layer (8), the microfluidic device (1000-1003) further comprising a membrane layer (16) arranged above the cover layer (8) in such a way to cover the air exhaust channels (5) and configured such as to be impermeable to said fluid and permeable to said gas.

9. The microfluidic device according to claim 8, wherein the air exhaust channels (5) further extend through the flexible layer (14), and wherein the membrane layer (16) is arranged above the flexible layer (14).

10. The microfluidic device according to any one of the preceding claims, wherein the inlet region (30) is accessible through a pipette or micro pipette for supplying said fluid.

11. The microfluidic device according to claim 5 or any one of claims 6-10 when depending on claim 5, wherein the body (2) houses one or more grooves (10) extending at the first side (2a) at least partially around one or more of the wells (4), the cover layer (8) being sealed to the body (2) by means of glue extending within said grooves (10).

12. The microfluidic device according to claim 11, wherein the glue is a biocompatible, non-fluorescent, glue.

13. The microfluidic device according to claim 5 or any one of claims 6-10 when depending on claim 5, further comprising a first bi-adhesive layer (20) arranged between the body (2) and the cover layer (8), configured to couple the cover layer (8) to the body (2).

14. The microfluidic device according to claim 13, wherein the first bi-adhesive layer (20) is provided with at least a couple of inspection holes (101), extending through first bi-adhesive layer (20) for its entire thickness, at least partially aligned with a respective well (4).

15. The microfluidic device according to any one of the preceding claims, further comprising an integrated heater (220) formed at the second side (2b) of the body (2).

16. The microfluidic device according to any one of the preceding claims, further comprising an integrated temperature sensor (223) formed at the second side (2b) of the body (2).

17. The microfluidic device according to any one of the preceding claims, forming a microreactor, wherein each well (4) forms a reaction chambers, and accommodates an array of nucleic acid probes (230) at respective locations, for hybridizing to respective target nucleic acids; and wherein said fluid is a solution (250) containing primers, capable of binding to target nucleic acids, nucleotides, nucleic acid extending enzymes and nucleic acids.

18. The microfluidic device according to claim 17 when depending on claim 4, wherein the flexible layer (14) is transparent to at least a first and a second wavelength, different from one another.

19. The microfluidic device according to claim 17 or 18 when depending on claim 5, wherein the cover layer (8) is transparent to at least a first and a second wavelength, different from one another.

20. The microfluidic device according to any one of claims 1-3, further comprising an enclosing structure (107) having lateral walls arranged on the first side (2a) of the body (2) in such a way to completely encircle the wells (4), said enclosing structure (107) being further provided

with a reservoir (109) fluidically coupled to the inlet region (30) and configured for containing an amount of said liquid higher than the amount of said liquid that can be contained by the inlet region (30).

21. A microfluidic device, comprising:

- a body (2) having a first side (2a) and a second side (2b) opposite to one another, said first side (2a) having:

- at least a couple of wells (4); an inlet region (30) forming an entrance point for a fluid to be supplied to the wells (4); a main channel (6a) fluidically connected to the inlet region (30); and at least a couple of secondary channels (6b) fluidically connecting the main channel (6a) to a respective well (4);

- a cover layer (8), arranged above the first side (2a) of the body (2), configured for sealing the wells (4) and provided with at least a first valve hole (54) which extends through the cover layer (8) and overlaps, at least partially, the secondary channels (6b);

- a flexible layer (14), arranged above the cover layer (8) and provided with at least a protrusion (74) extending through the first valve hole (54) towards the body (2) and overlapping, at least partially, the secondary channels (6b), the flexible layer (14) being configured

such that, when a pressure is applied on it, the protrusion (74) contacts the body (2) and enters within at least one of the secondary channels (6b), thus fluidically isolating one well (4) from the other well (4).

22. A cartridge (207) comprising:

- a microfluidic device (1000-1003) according to any one of the claims 1-20 or claim 21; and

- a device holder (100) configured to house said microfluidic device (1000-1003), including a base portion (102) and a cover portion (104) configured to be coupled to one another in such a way that a pressure is exerted on the microfluidic device along a direction parallel to the direction of extension of the protrusion (74), so that the protrusion (74) contacts the body (2) and enters within at least one of the secondary channels (6b), thus fluidically isolating one well (4) from the other well (4).

23. Apparatus for carrying out nucleic acid amplification, including a microfluidic device (1000-1005) according to any one of claims 1-20 or claim 21, or a cartridge (207) according to claim 22.

24. Apparatus according to claim 23, comprising a temperature control module (203, 211) for cyclically controlling an operative temperature of the solution (250) in accordance with a temperature profile.

25. Apparatus according to claim 23 or 24, comprising a reader device (204) and wherein the microfluidic device (1000-1005) is mounted on a board (209) to form a cartridge loadable into the reader device (204).

26. Apparatus according to claim 25, wherein the reader device (204) is an optical reader and includes:

- a light source (215) for illuminating the microfluidic device (1000-1005) with light at the first wavelength,; and

- an image detector (204), configured to receive fluorescence radiation at the second wavelength emitted by the microfluidic device, in response to the light at the first wavelength.

27. A method of manufacturing a microfluidic device (1000-1005), comprising the steps of providing a body (2) having a first side (2a) and a second side (2b) opposite to one another; and forming, facing the first side (2a) of the body (2) and extending within the body (2):

- at least a couple of wells (4) having a first depth (D_W);

- an inlet region (30) which is an entrance point for a fluid to be supplied to the wells (4);

- a main channel (6a), fluidically connected to the inlet region (30), and having a second depth (D_{MC}); and

at least a couple of secondary channels (6b), fluidically connecting the main channel (6a) to a respective well (4), and having a third depth (D_{CC}),

wherein the first depth (D_W) is greater than the second depth (D_{MC}), and the second depth (D_{MC}) is greater than the third depth (D_{CC}).

28. The method of manufacturing according to claim 27, further comprising:

- arranging a cover layer (8) above the first side (2a) of the body (2), so as to seal the wells (4), the cover layer (8) being provided with at least a first valve hole (54) which extends through the cover layer (8) and overlaps, at least partially, the secondary channels (6b); and

- arranging a flexible layer (14) above the cover layer (8), the flexible layer (14) being provided with at least a protrusion (74) extending through the first valve hole towards the body (2) and overlapping, at least partially, the secondary channels (6b).

29. A method of manufacturing a microfluidic device, comprising:

- providing a body (2) having a first side (2a) and a second side (2b) opposite to one another;
- forming, at the first side (2a) of the body (2), at

least a couple of wells (4), an inlet region (30) which is an entrance point for a fluid to be supplied to the wells (4); a main channel (6a) fluidically connected to the inlet region (30); and at least a couple of secondary channels (6b) fluidically connecting the main channel (6a) to a respective well (4);

- arranging a cover layer (8) above the first side (2a) of the body (2), so as to seal the wells (4), the cover layer (8) being and provided with at least a first valve hole (54) which extends through the cover layer (8) and overlaps, at least partially, the secondary channels (6b);

- arranging a flexible layer (14) above the cover layer (8), the flexible layer (14) being provided with at least a protrusion (74) extending through the first valve hole towards the body (2) and overlapping, at least partially, the secondary channels (6b).

30. A method of operating the microfluidic device of claim 4 or the microfluidic device of claim 21, comprising:

- supplying a liquid solution at the inlet region (30); and

- after the step of supplying, applying a pressure on the flexible layer (14) such that the protrusion (74) contacts the body (2) and enters within at least one of the

secondary channels (6b), thus fluidically isolating one well (4) from the other well (4).

31. A method of performing a chemical analysis, said method comprising applying a sample to the inlet region of any microfluidic device of claims 1-21, inserting said microfluidic device into a reader device, activating said reader device and obtaining a result of a chemical analysis.

32. The method of claim 31, wherein said chemical analysis is a DNA amplification and detection of same, and said sample is a biological fluid.

33. The method of claim 31, wherein said chemical analysis is an antibody-antigen binding reaction and detection of same, and said sample is a biological fluid.

34. The method of claim 31, wherein said chemical analysis is an enzymatic reaction and detection of same, and said sample is a biological fluid.

p.i.: 1) STMICROELECTRONICS S.R.L.

2) BIOMERIEUX S.A.

Simone BERTOLOTTO

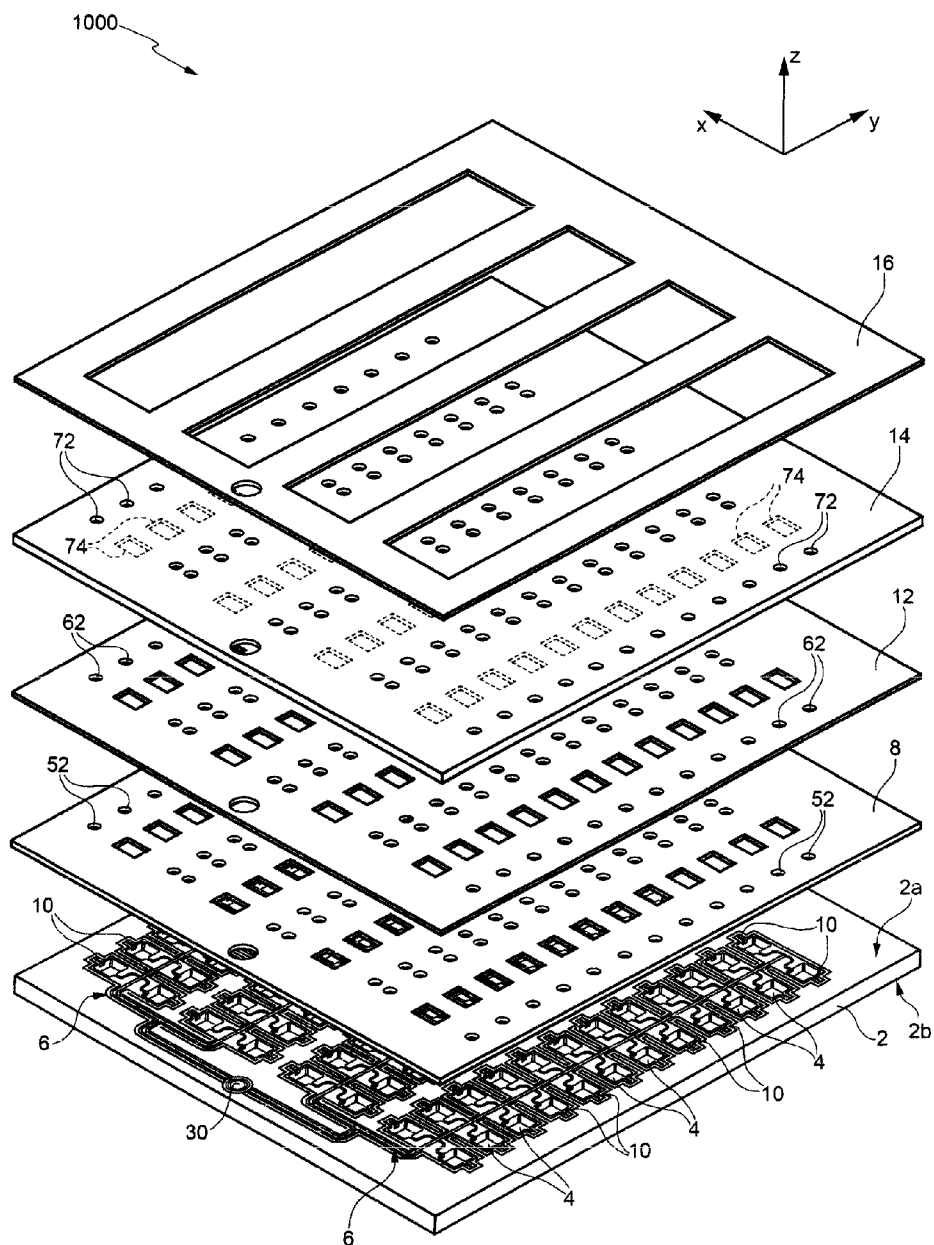


FIG. 1a

p.i.: 1) STMICROELECTRONICS S.R.L.
2) BIOMERIEUX S.A.

Simone BERTOLOTTO
(Iscrizione Albo nr. 1422/B)

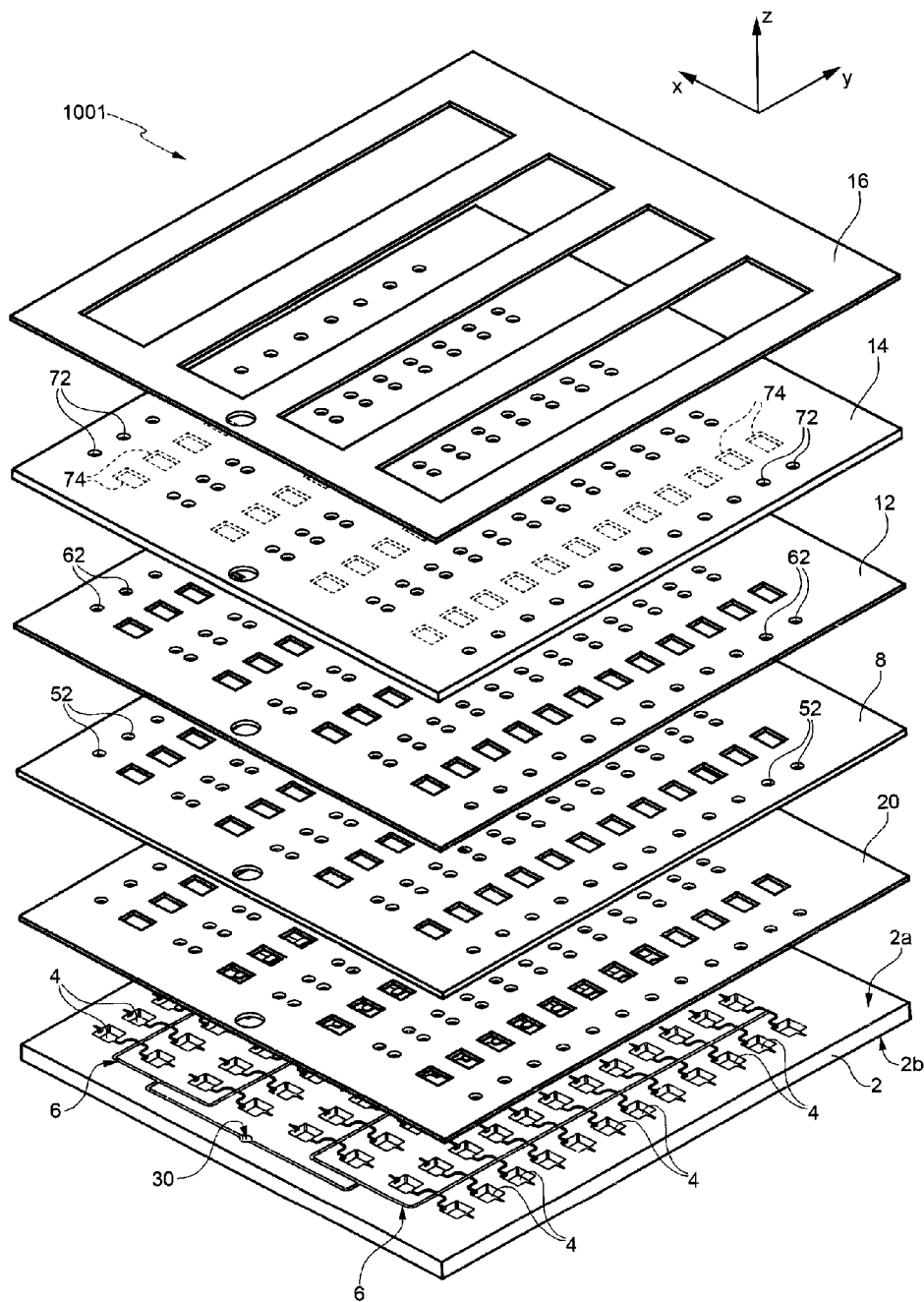


FIG. 2a

p.i.: 1) STIMICROELECTRONICS S.R.L.
2) BIOMERIEUX S.A.

Simone BERTOLOTTO
(Iscrizione Albo nr. 1422/B)

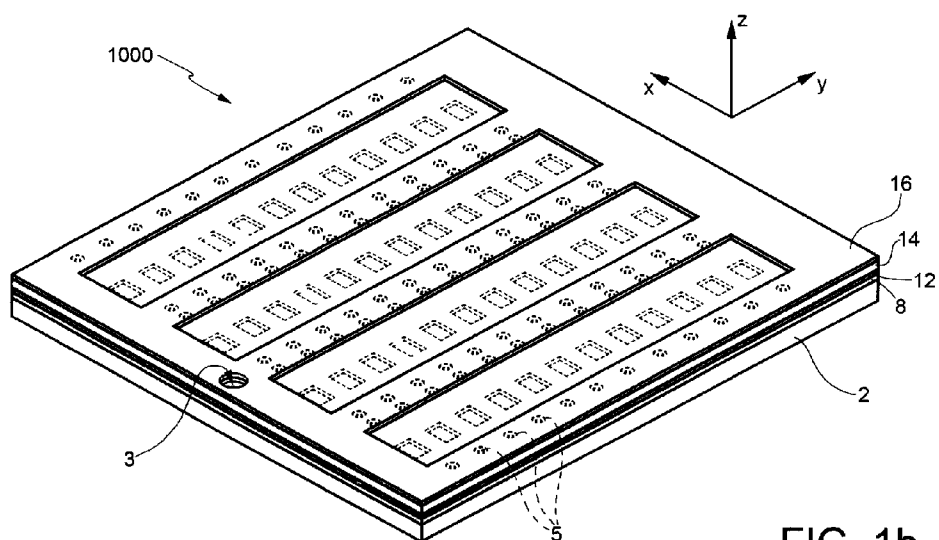


FIG. 1b

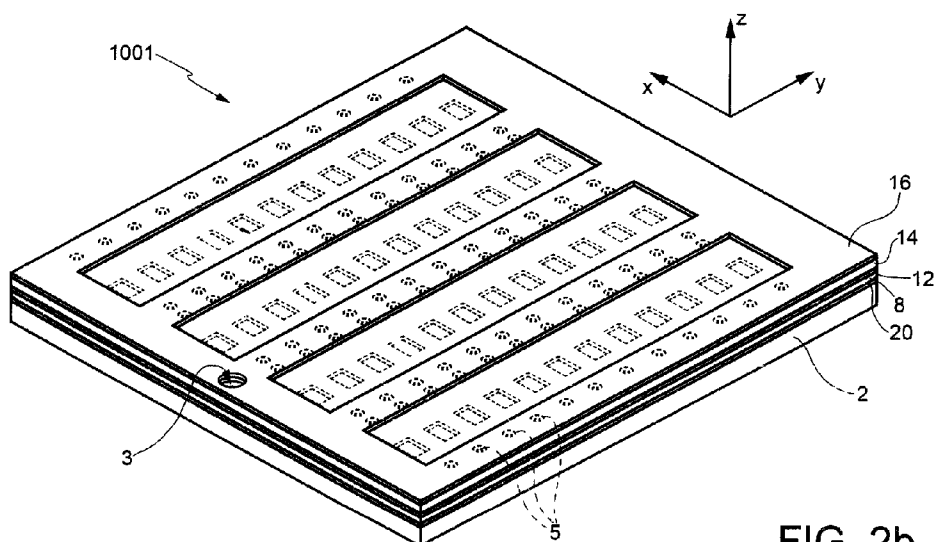


FIG. 2b

p.i.: 1) STMICROELECTRONICS S.R.L.
2) BIOMERIEUX S.A.

Simone BERTOLOTTO
(Iscrizione Albo nr. 1422/B)

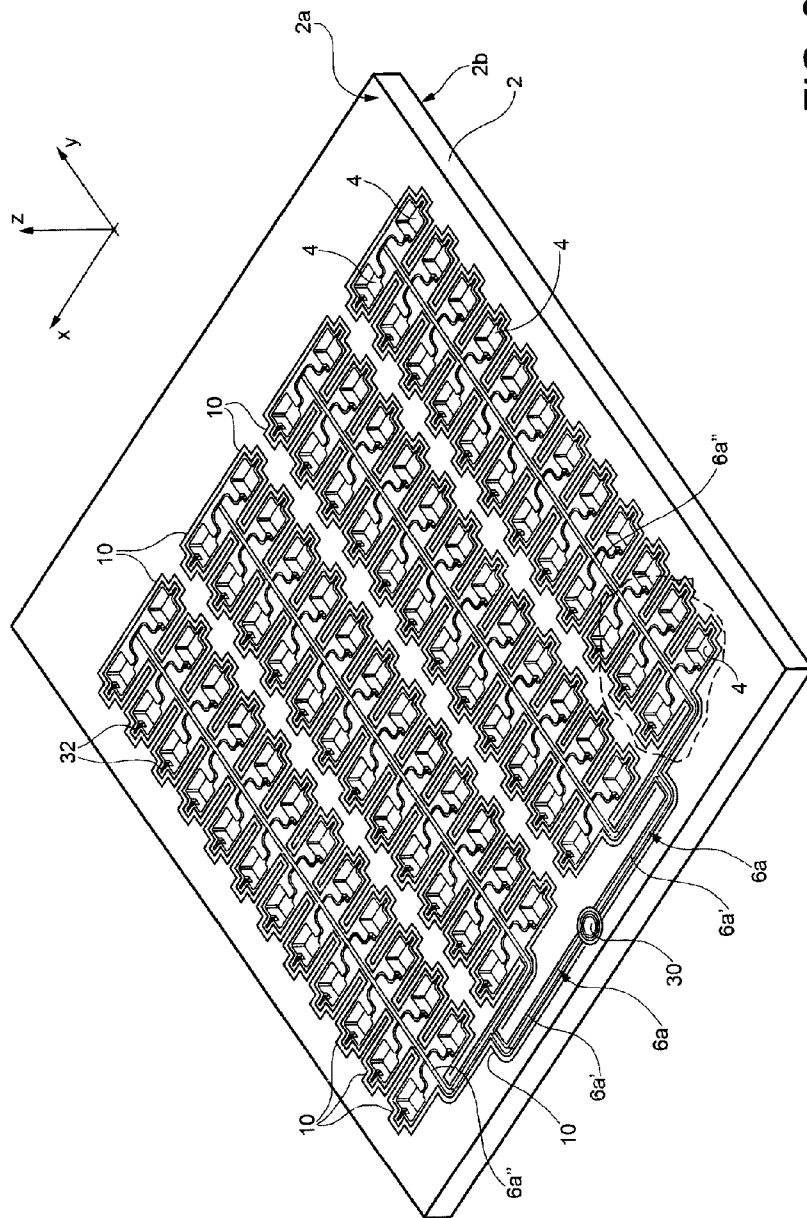


FIG. 3a

p.i.: 1) STMICROELECTRONICS S.R.L.
2) BIOMERIEUX S.A.

Simone BERTOLOTTO
(Iscrizione Albo nr. 1422/B)

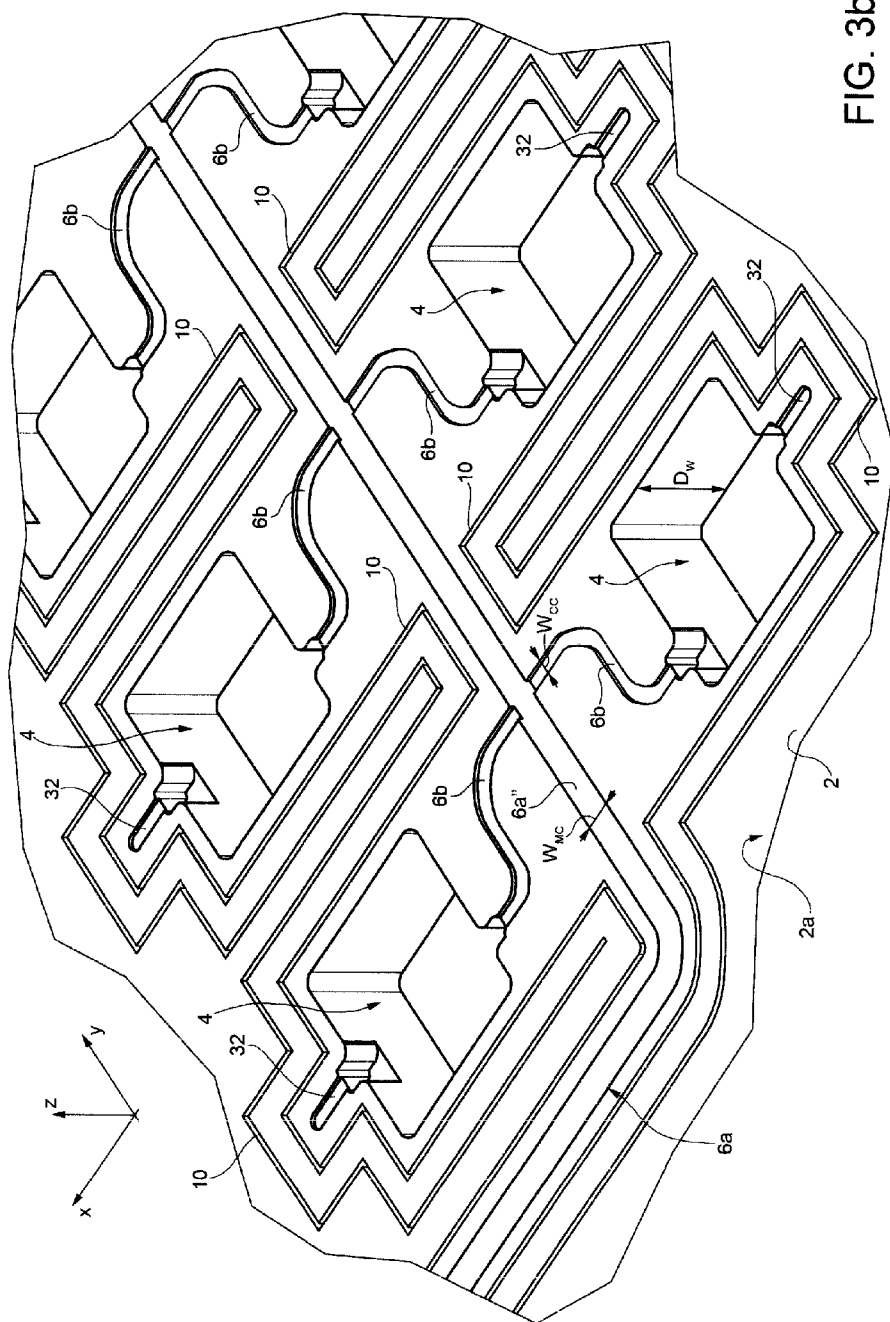


FIG. 3b

p.i.: 1) STMICROELECTRONICS S.R.L.
2) BIOMERIEUX S.A.

Simone BERTOLOTTO
(Iscrizione Albo nr. 1422/B)

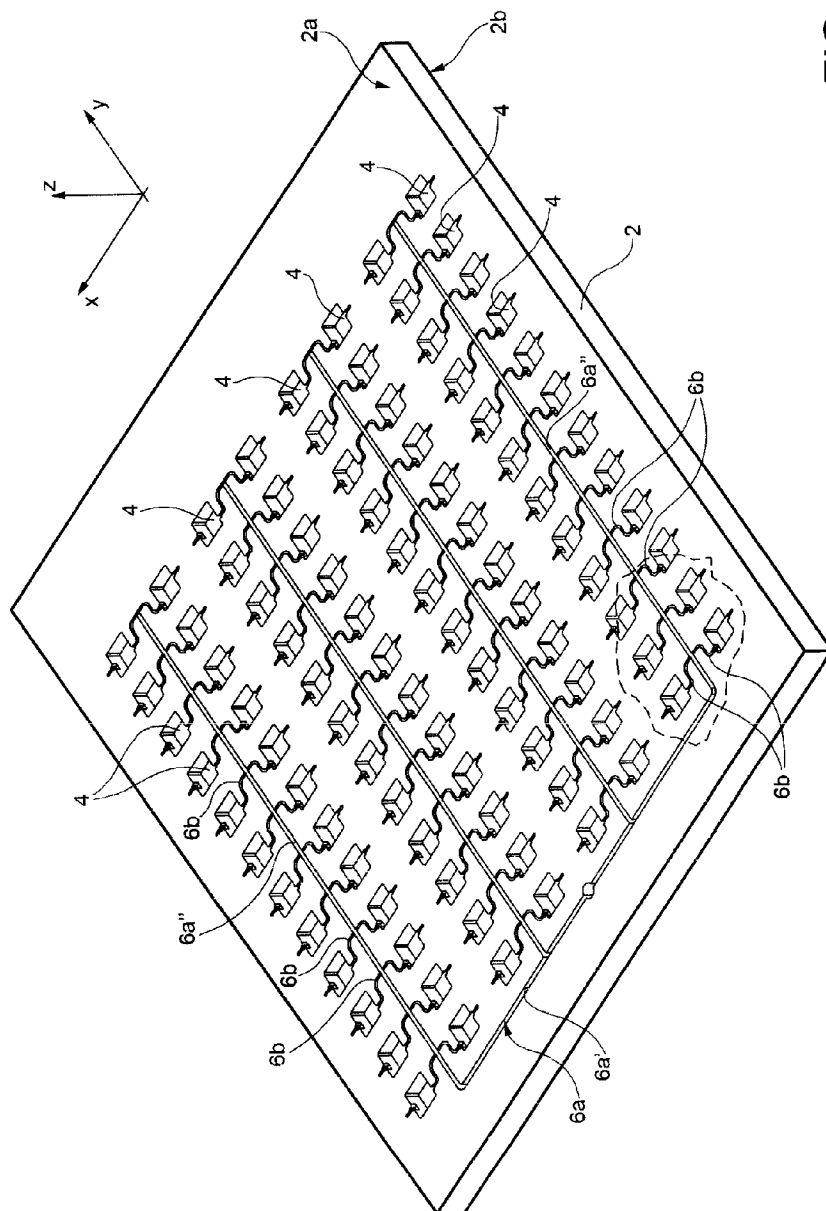


FIG. 4a

p.i.: 1) STMICROELECTRONICS S.R.L.
2) BIOMERIEUX S.A.

Simone BERTOLOTTO
(Iscrizione Albo nr. 1422/B)

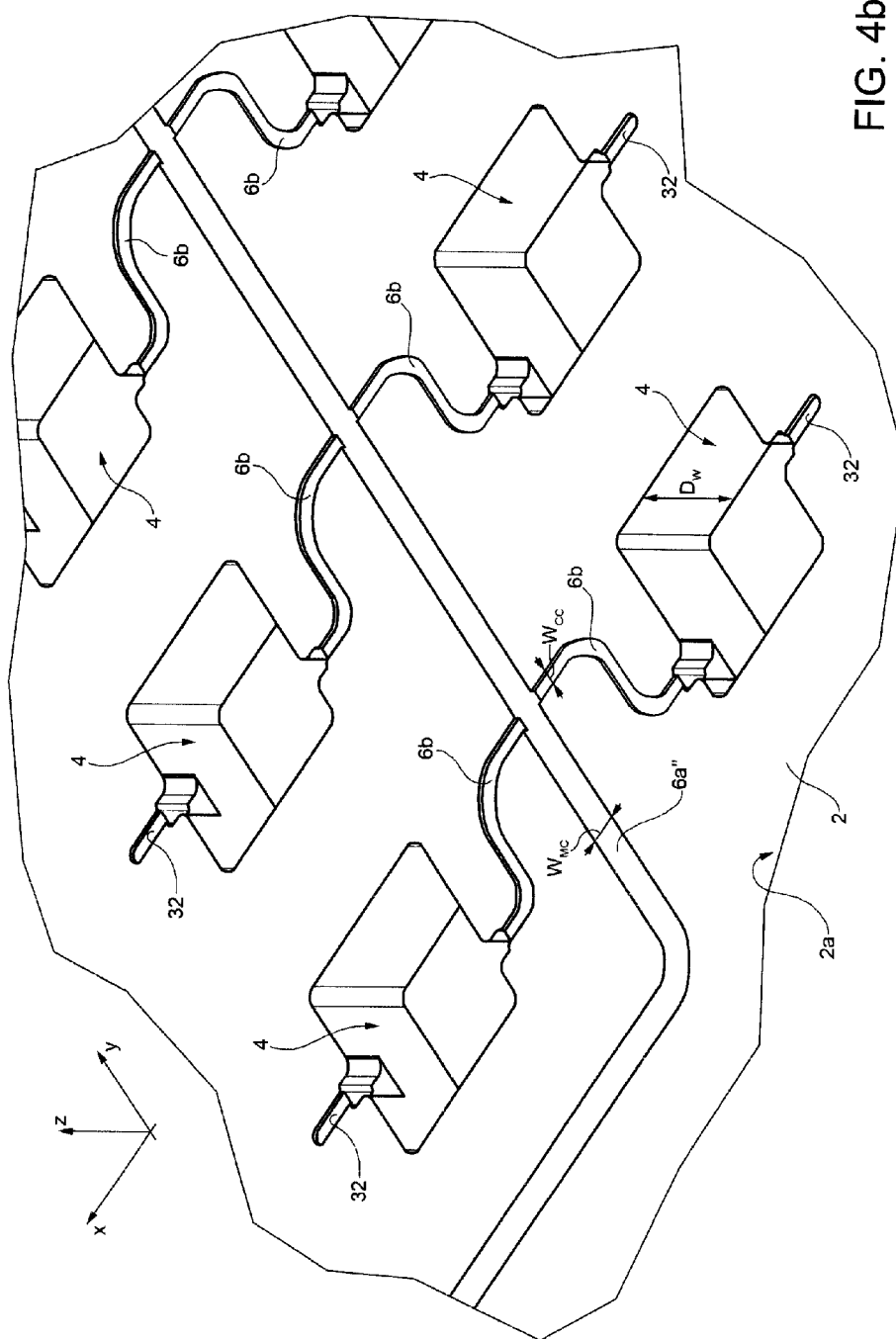


FIG. 4b

p.i.: 1) STMICROELECTRONICS S.R.L.
2) BIOMERIEUX S.A.

Simone BERTOLOTTO
(Iscrizione Albo nr. 1422/B)

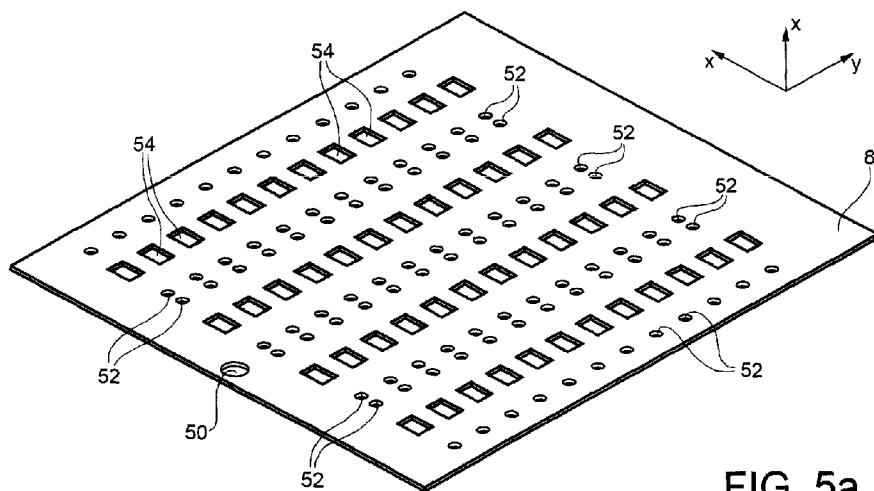


FIG. 5a

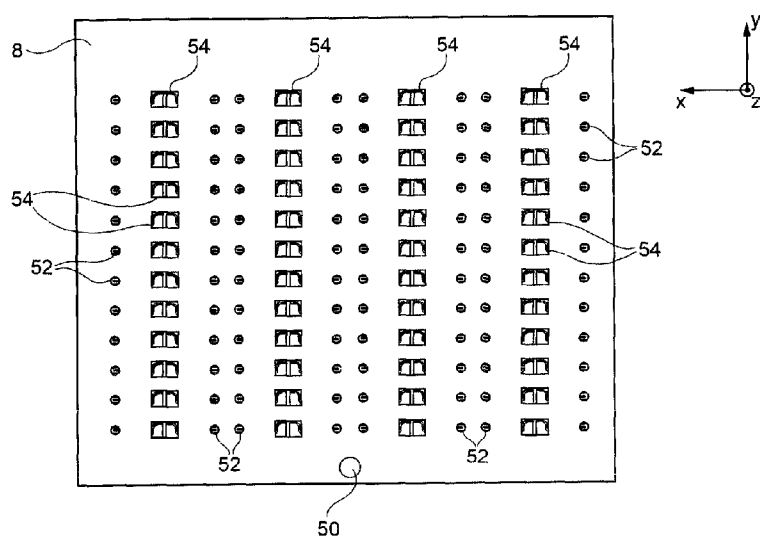


FIG. 5b

p.i.: 1) STMICROELECTRONICS S.R.L.
2) BIOMERIEUX S.A.

Simone BERTOLOTTO
(Iscrizione Albo nr. 1422/B)

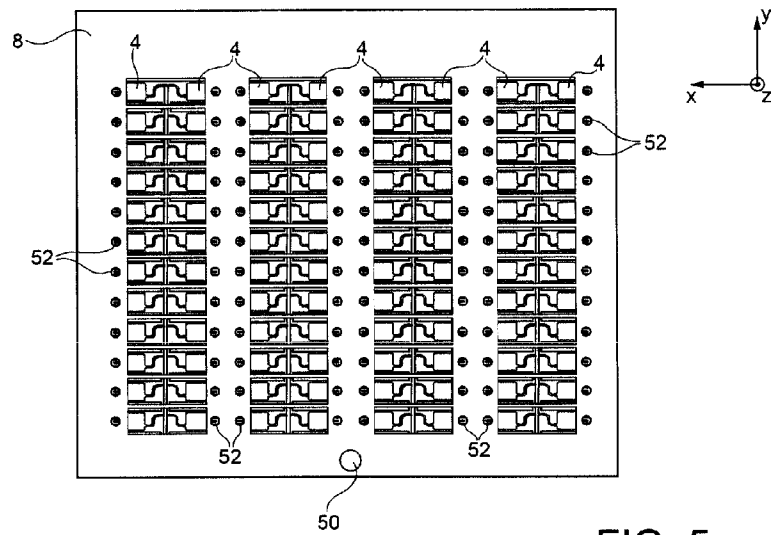


FIG. 5c

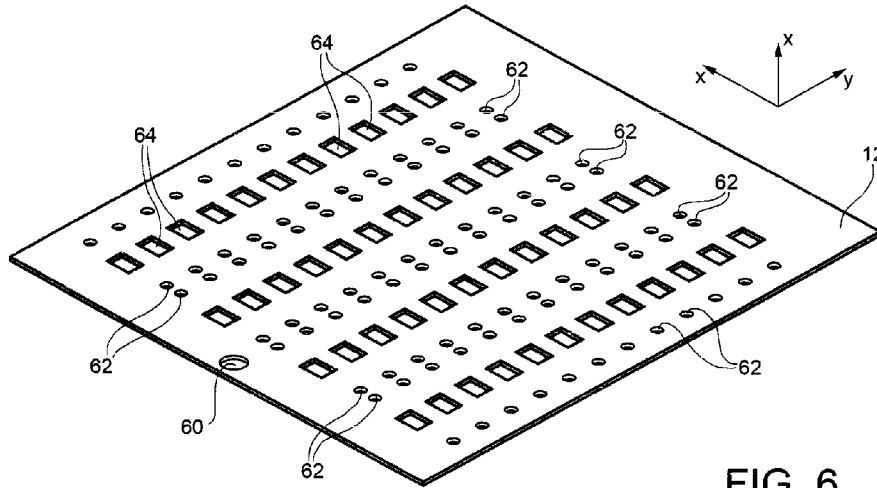


FIG. 6

p.i.: 1) STMICROELECTRONICS S.R.L.
2) BIOMERIEUX S.A.

Simone BERTOLOTTO
(Iscrizione Albo nr. 1422/B)

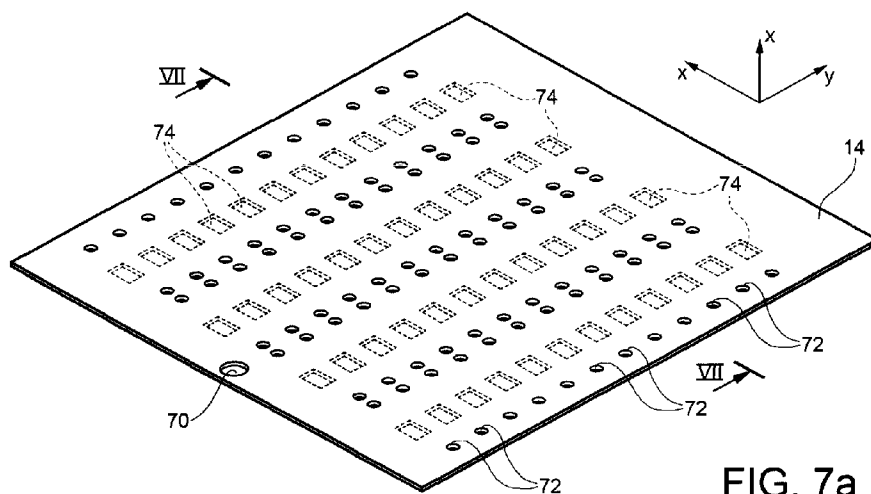


FIG. 7a

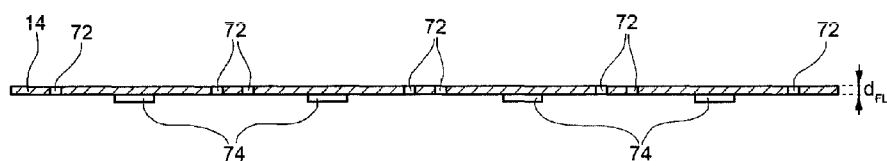


FIG. 7b

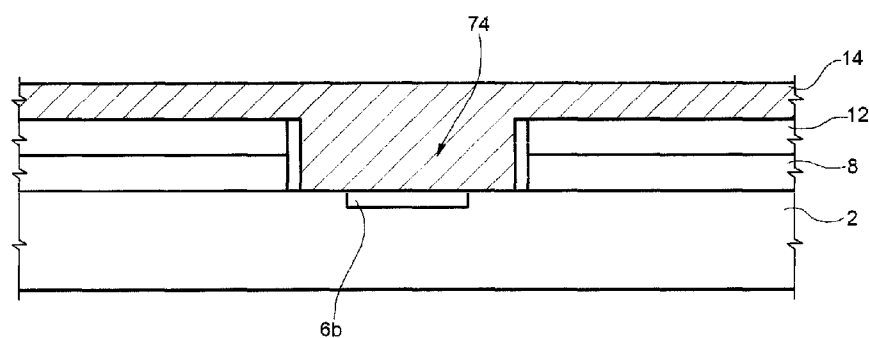


FIG. 7c

p.i.: 1) STMICROELECTRONICS S.R.L.
2) BIOMERIEUX S.A.

Simone BERTOLOTTO
(Iscrizione Albo nr. 1422/B)

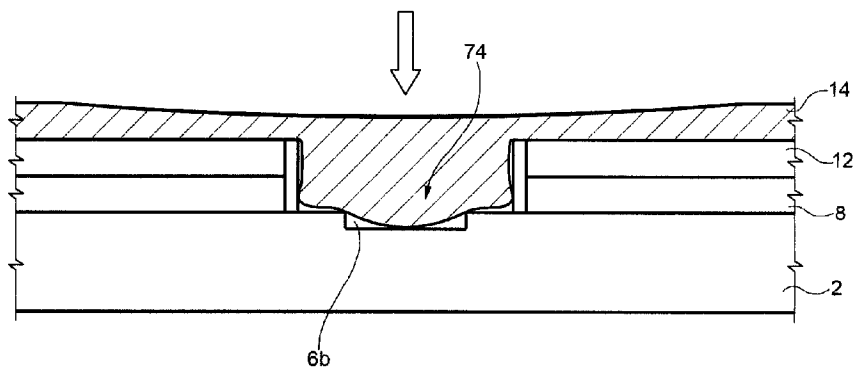


FIG. 7d

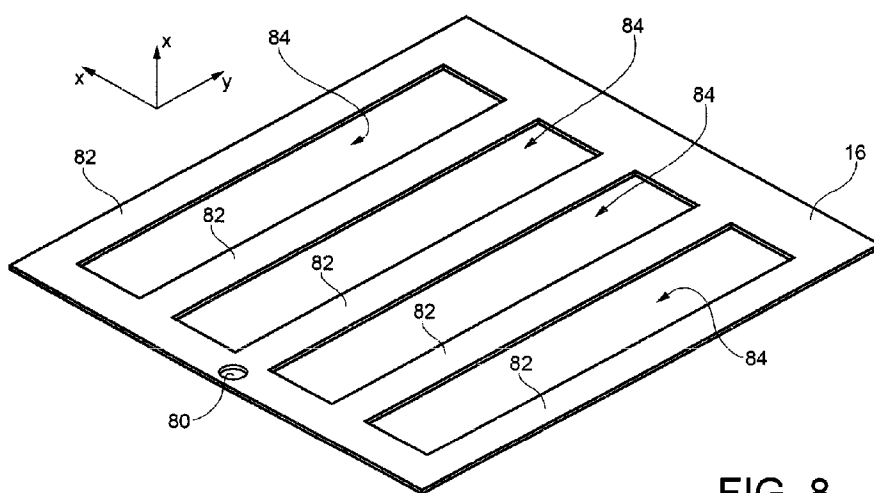


FIG. 8

p.i.: 1) STMICROELECTRONICS S.R.L.
2) BIOMERIEUX S.A.

Simone BERTOLOTTO
(Iscrizione Albo nr. 1422/B)

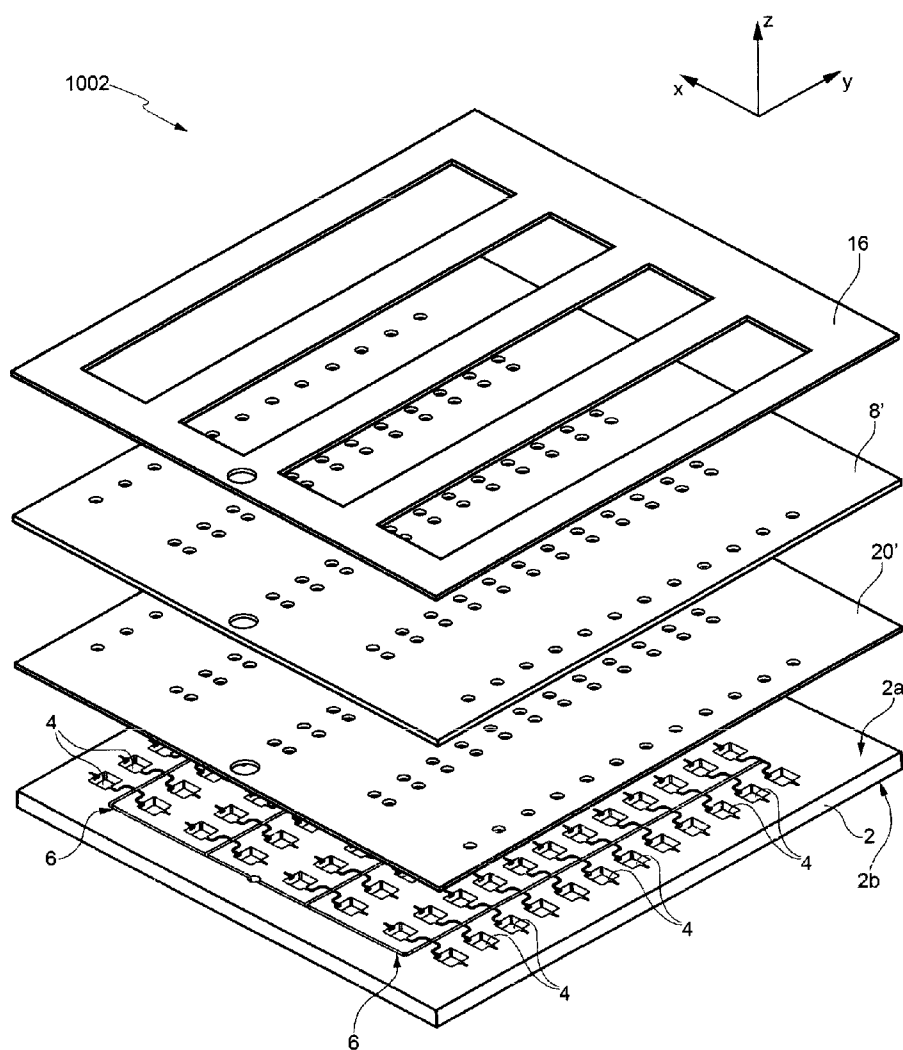


FIG. 9

p.i.: 1) STMICROELECTRONICS S.R.L.
2) BIOMERIEUX S.A.

Simone BERTOLOTTO
(Iscrizione Albo nr. 1422/B)

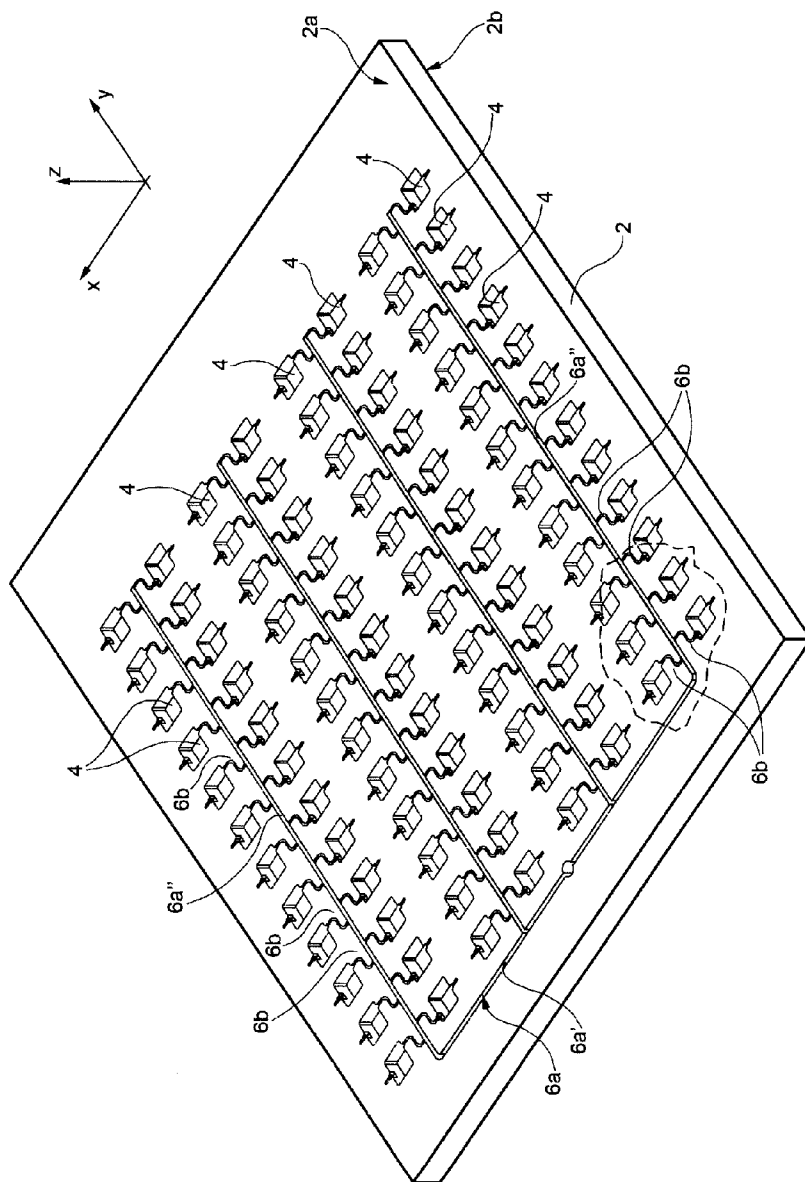


FIG. 10a

p.i.: 1) STMICROELECTRONICS S.R.L.
2) BIOMERIEUX S.A.

Simone BERTOLOTTO
(Iscrizione Albo nr. 1422/B)

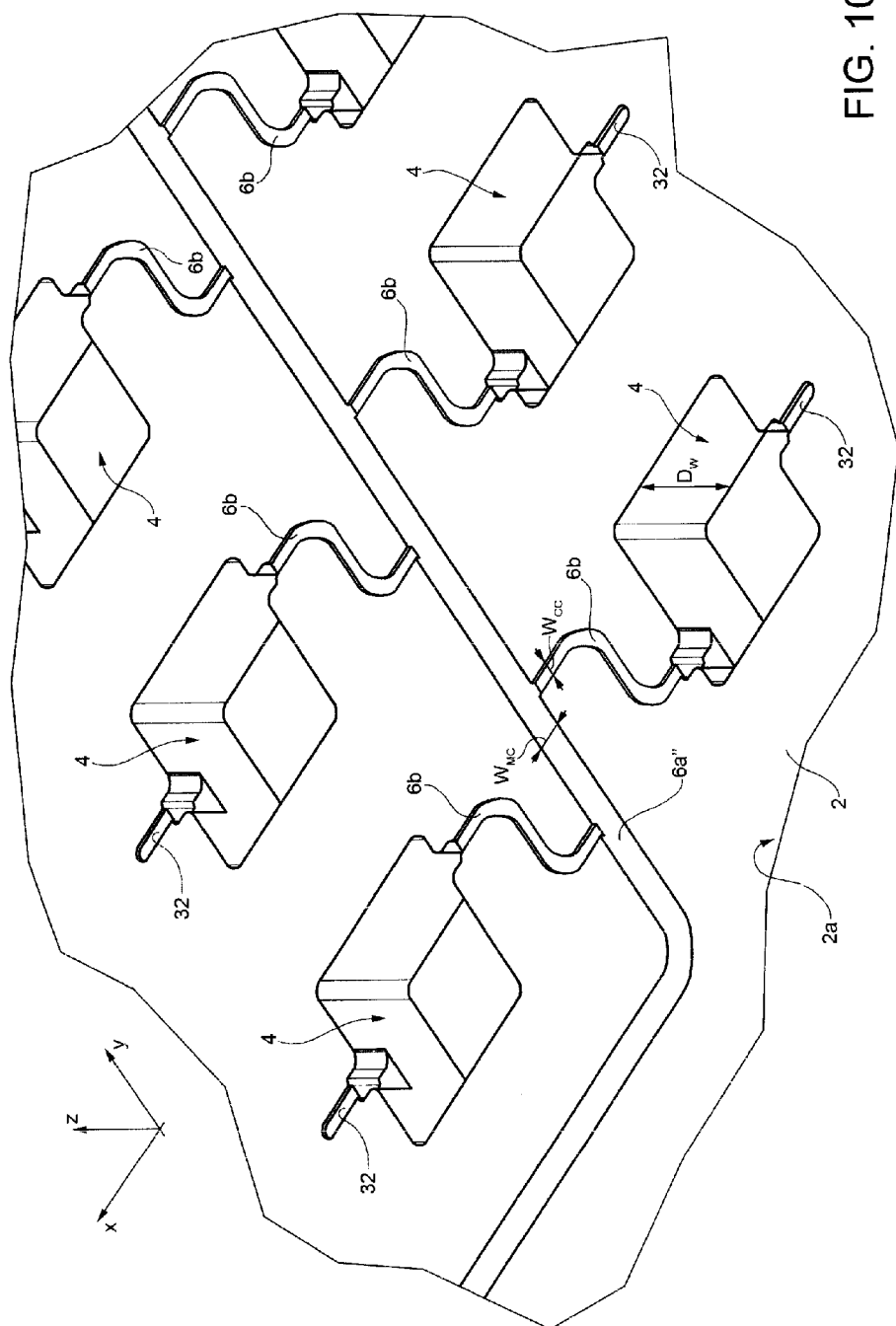


FIG. 10b

p.i.: 1) STMICROELECTRONICS S.R.L.
2) BIOMERIEUX S.A.

Simone BERTOLOTTO
(Iscrizione Albo nr. 1422/B)

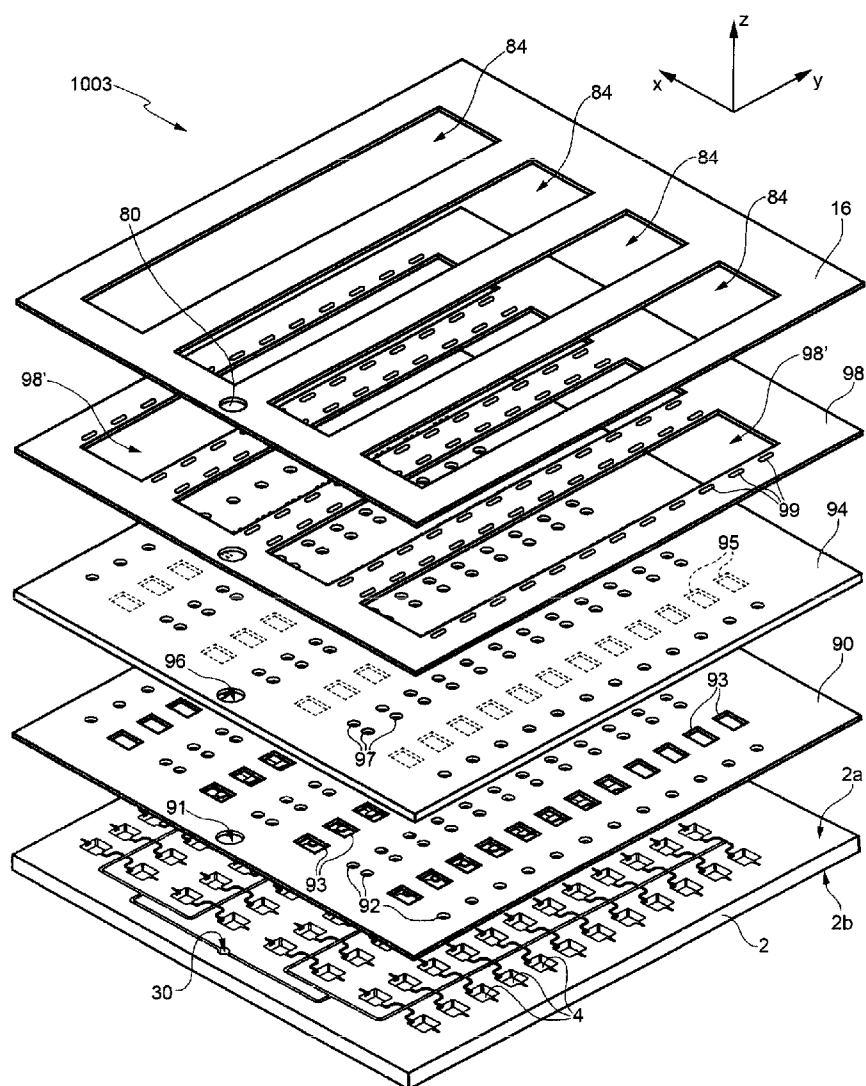


FIG. 11

p.i.: 1) STMICROELECTRONICS S.R.L.
2) BIOMERIEUX S.A.

Simone BERTOLOTTO
(Iscrizione Albo nr. 1422/B)

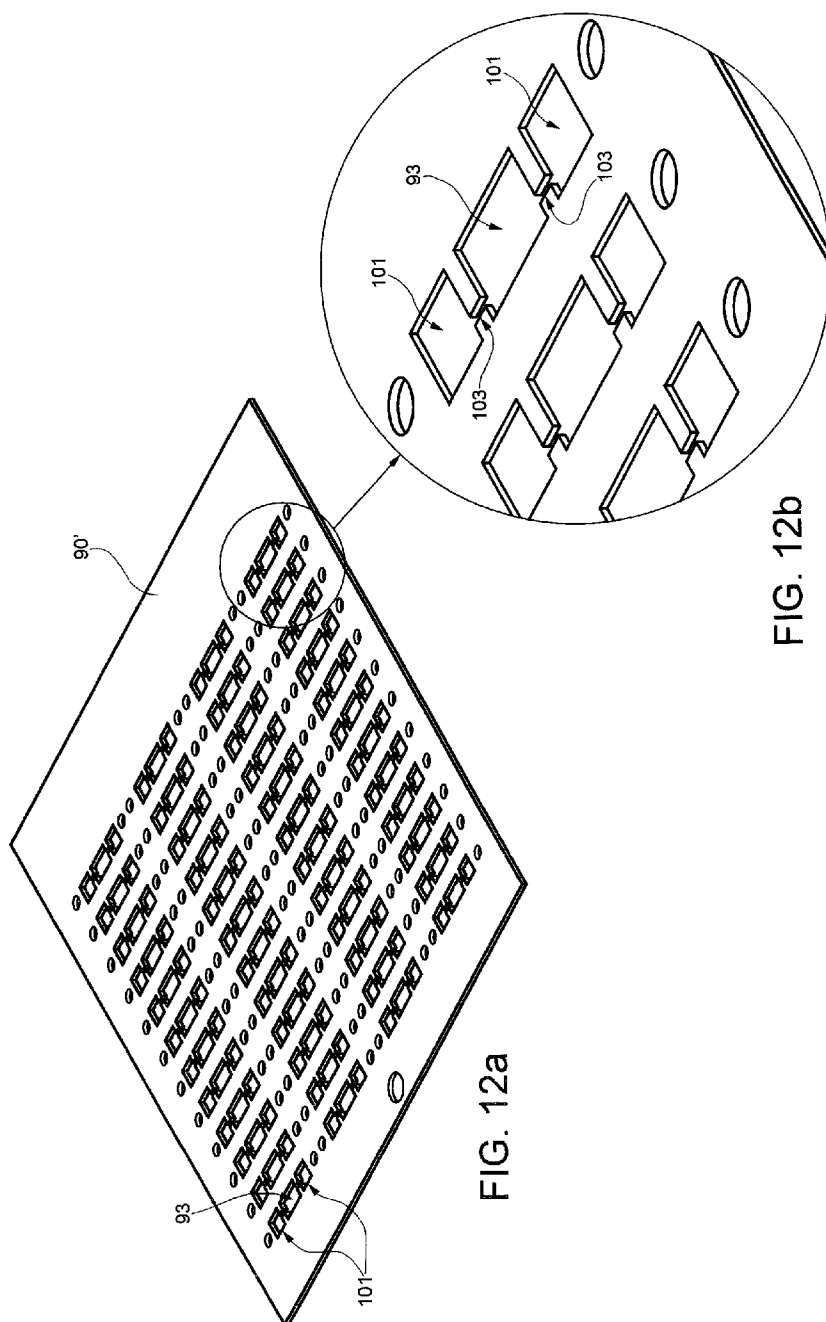


FIG. 12a

FIG. 12b

p.i.: 1) STMICROELECTRONICS S.R.L.
2) BIOMERIEUX S.A.

Simone BERTOLOTTO
(Iscrizione Albo nr. 1422/B)

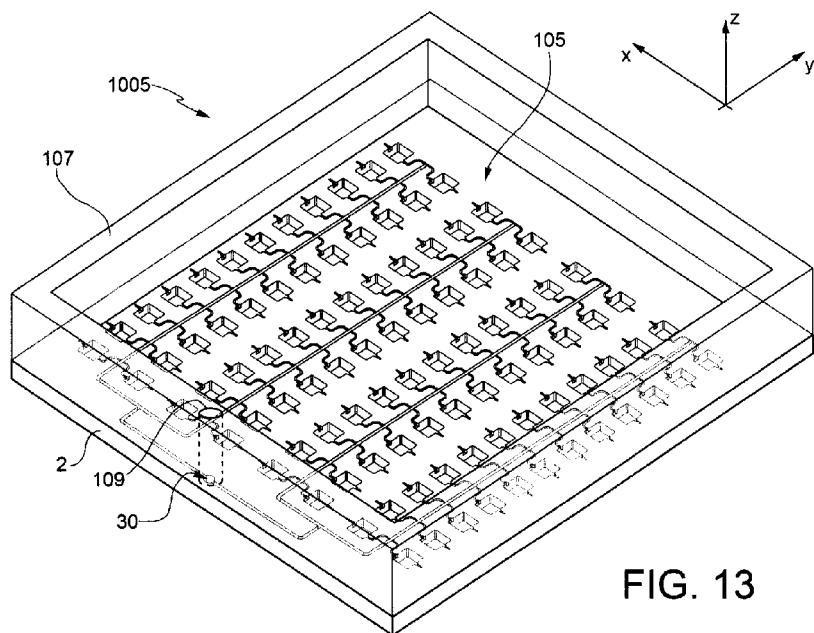


FIG. 13

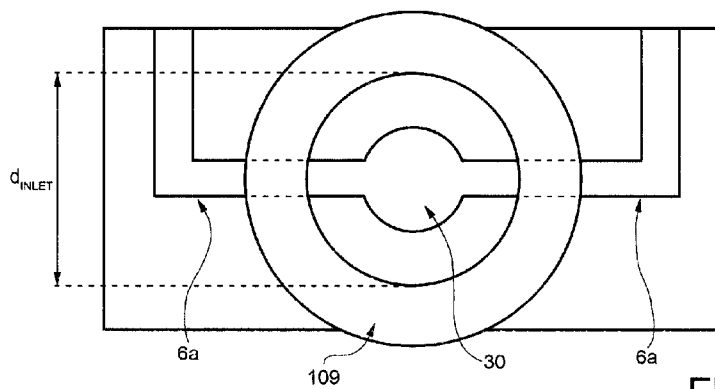


FIG. 14

p.i.: 1) STMICROELECTRONICS S.R.L.
2) BIOMERIEUX S.A.

Simone BERTOLOTTO
(Iscrizione Albo nr. 1422/B)

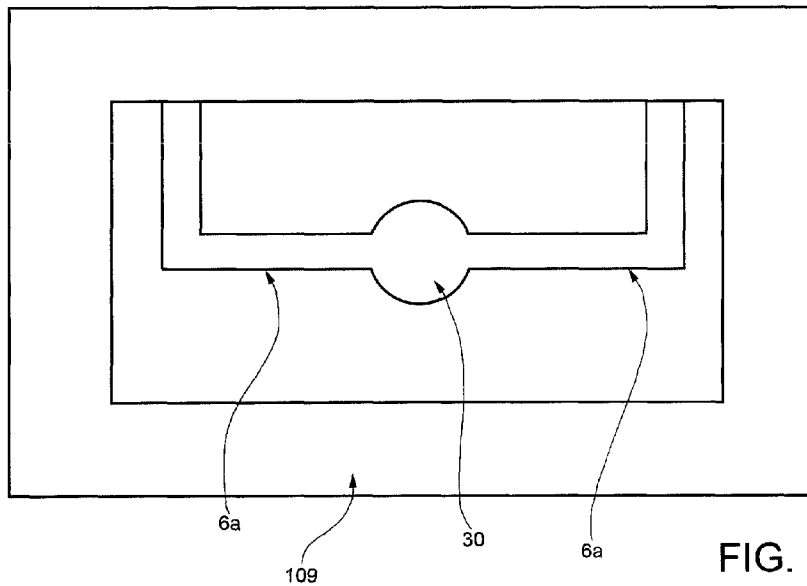


FIG. 15

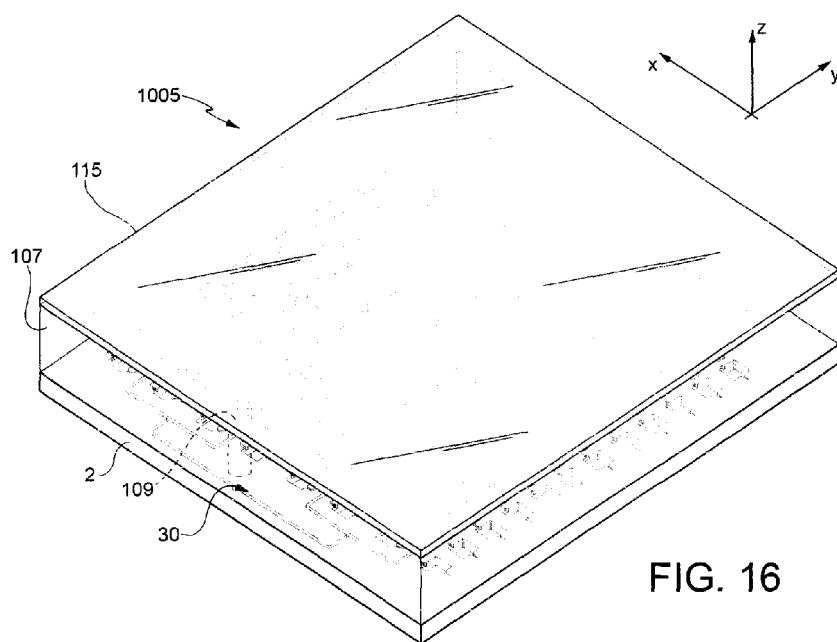


FIG. 16

p.i.: 1) STMICROELECTRONICS S.R.L.
2) BIOMERIEUX S.A.

Simone BERTOLOTTO
(Iscrizione Albo nr. 1422/B)

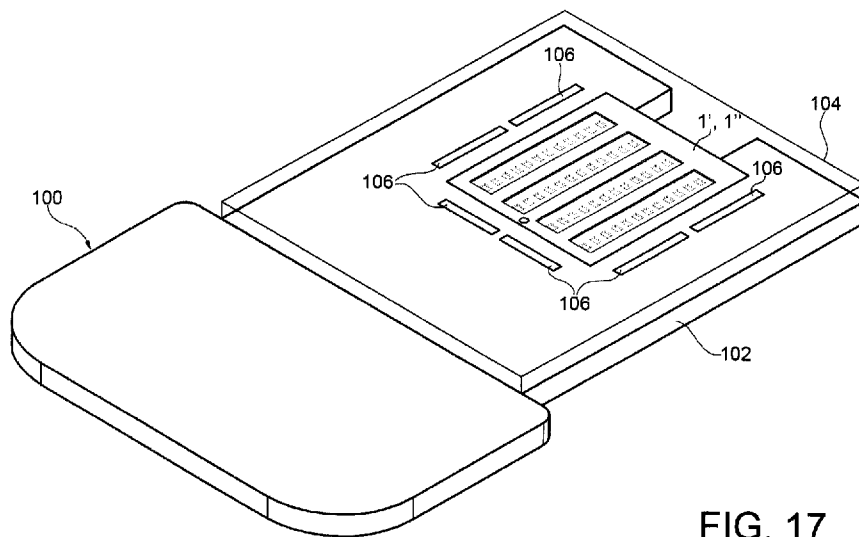


FIG. 17

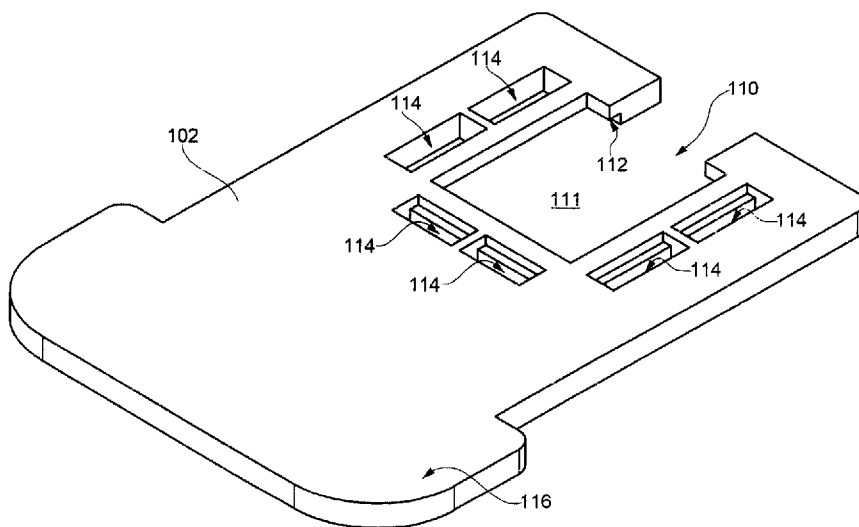


FIG. 18

p.i.: 1) STMICROELECTRONICS S.R.L.
2) BIOMERIEUX S.A.

Simone BERTOLOTTO
(Iscrizione Albo nr. 1422/B)

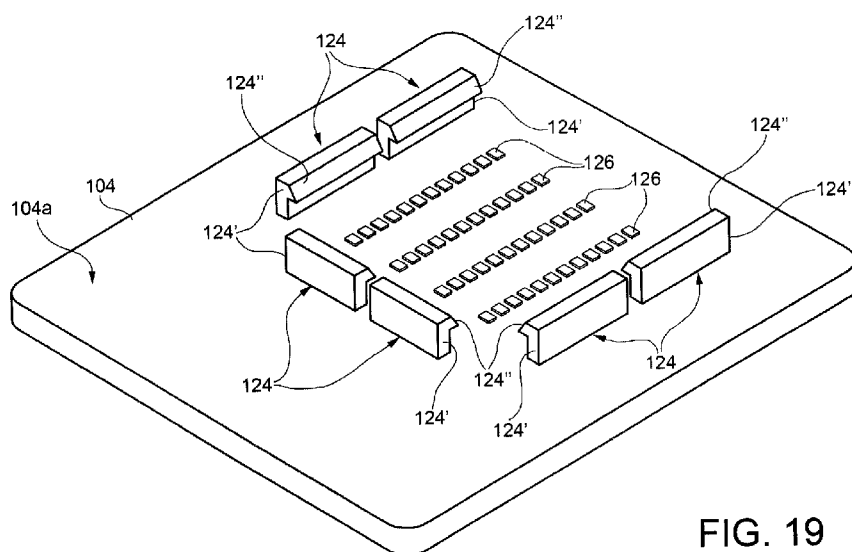


FIG. 19

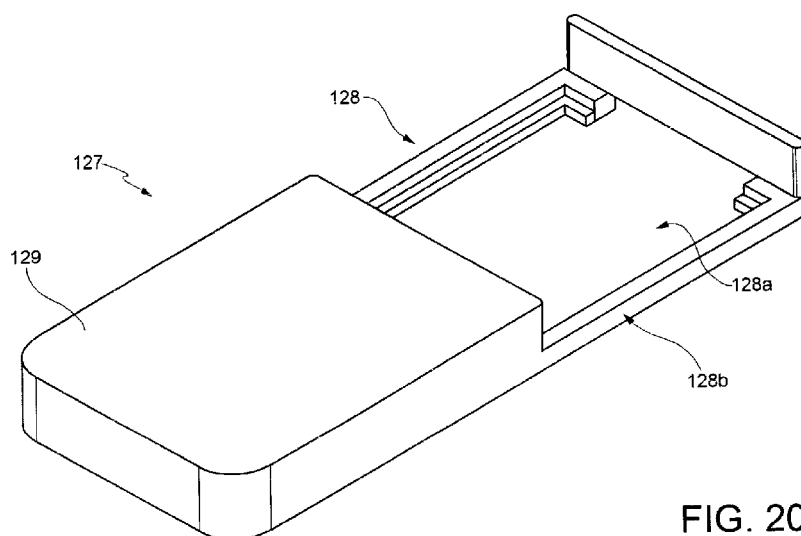


FIG. 20

p.i.: 1) STMICROELECTRONICS S.R.L.
2) BIOMERIEUX S.A.

Simone BERTOLOTTO
(Iscrizione Albo nr. 1422/B)

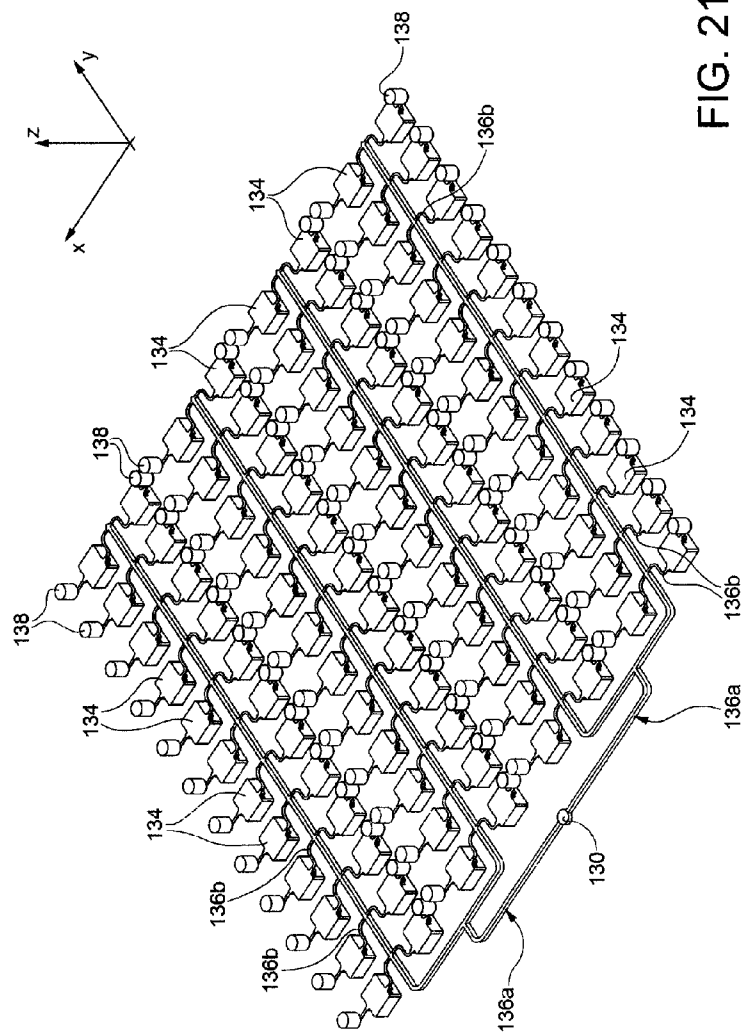


FIG. 21a

p.i.: 1) STMICROELECTRONICS S.R.L.
2) BIOMERIEUX S.A.

Simone BERTOLOTTO
(Iscrizione Albo nr. 1422/B)

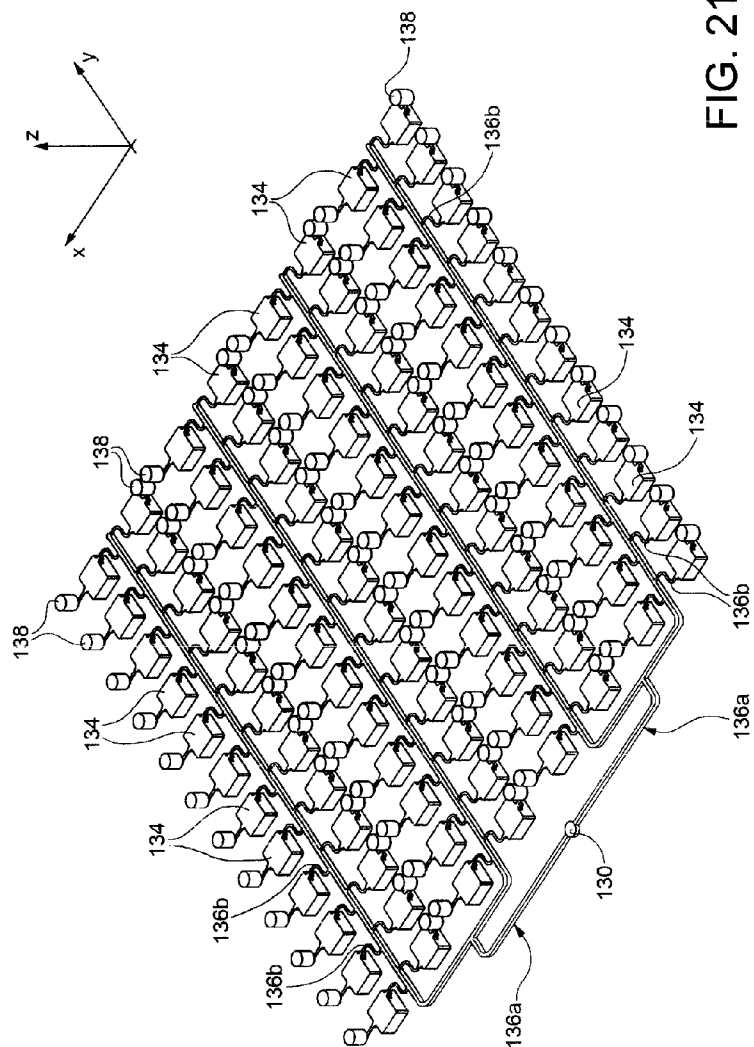


FIG. 21b

p.i.: 1) STMICROELECTRONICS S.R.L.
2) BIOMERIEUX S.A.

Simone BERTOLOTTO
(Iscrizione Albo nr. 1422/B)

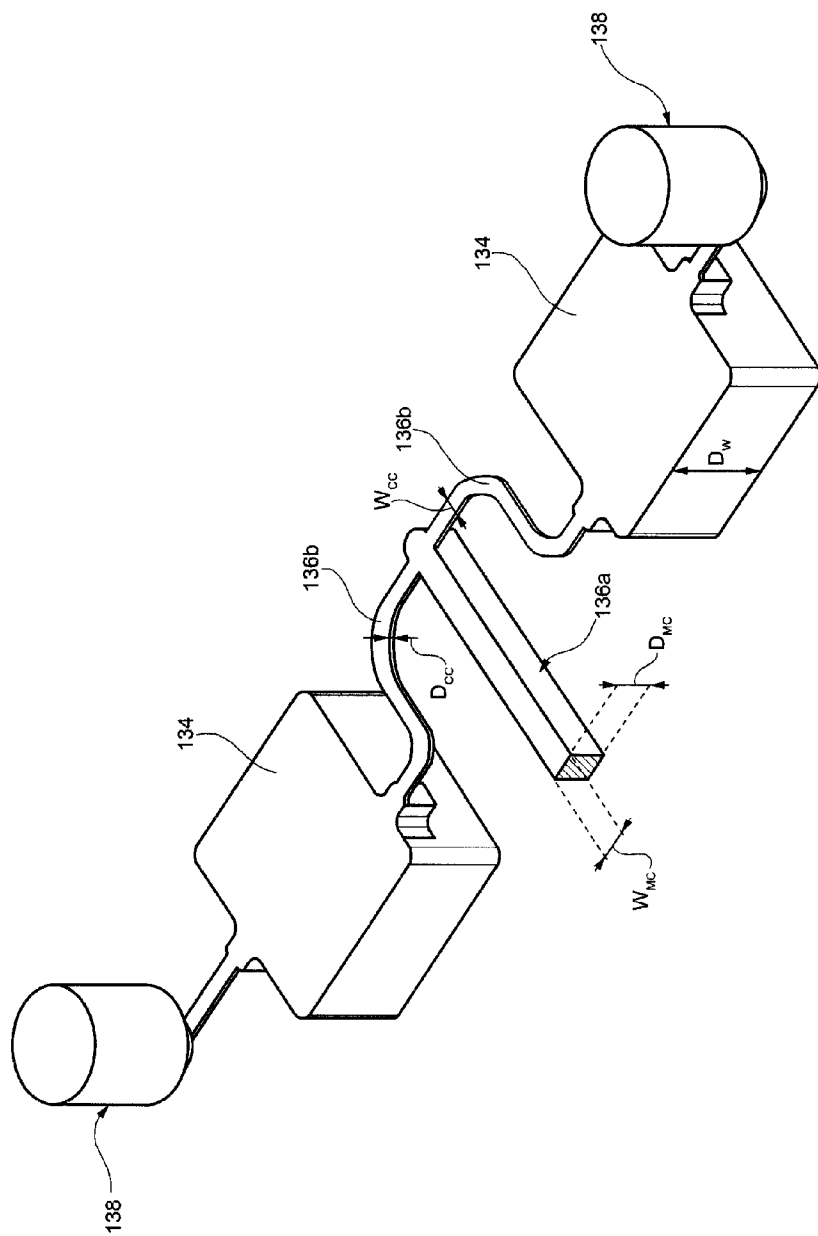


FIG. 22a

p.i.: 1) STMICROELECTRONICS S.R.L.
2) BIOMERIEUX S.A.

Simone BERTOLOTTO
(Iscrizione Albo nr. 1422/B)

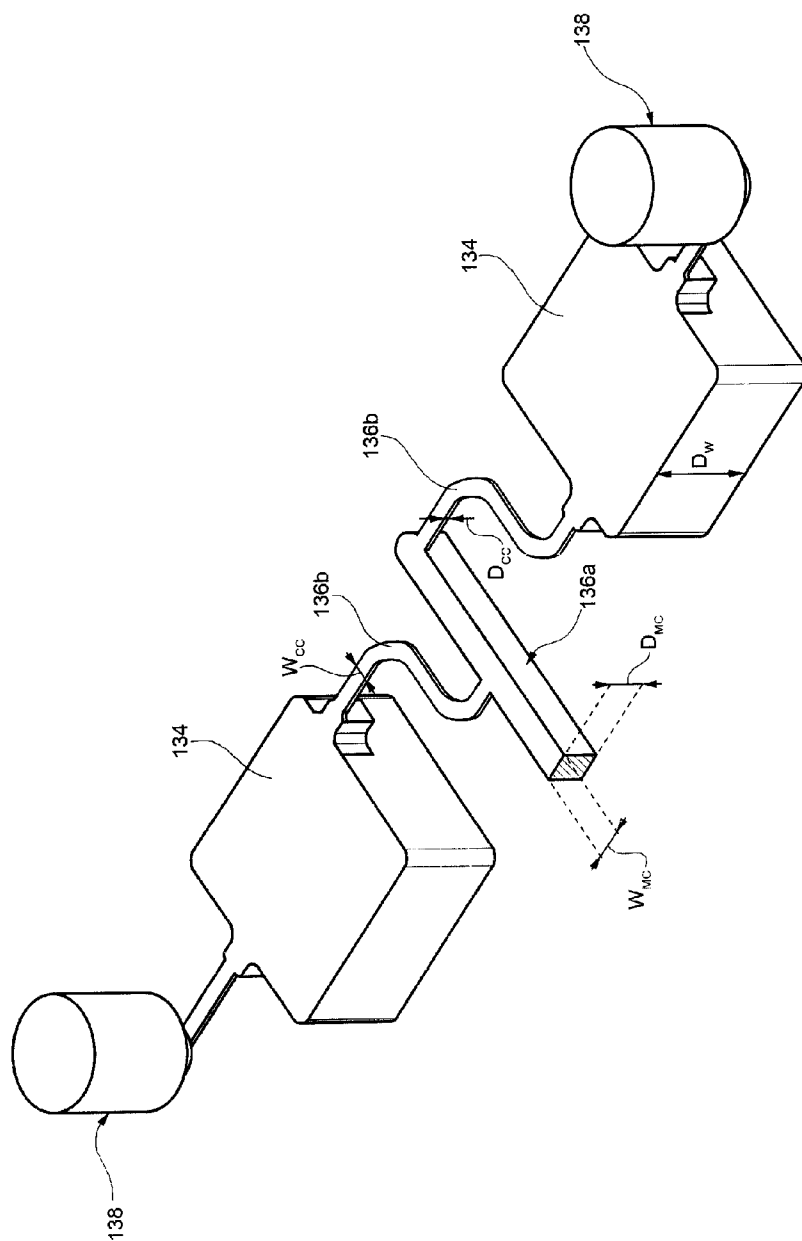


FIG. 22b

p.i.: 1) STMICROELECTRONICS S.R.L.
2) BIOMERIEUX S.A.

Simone BERTOLOTTO
(Iscrizione Albo nr. 1422/B)

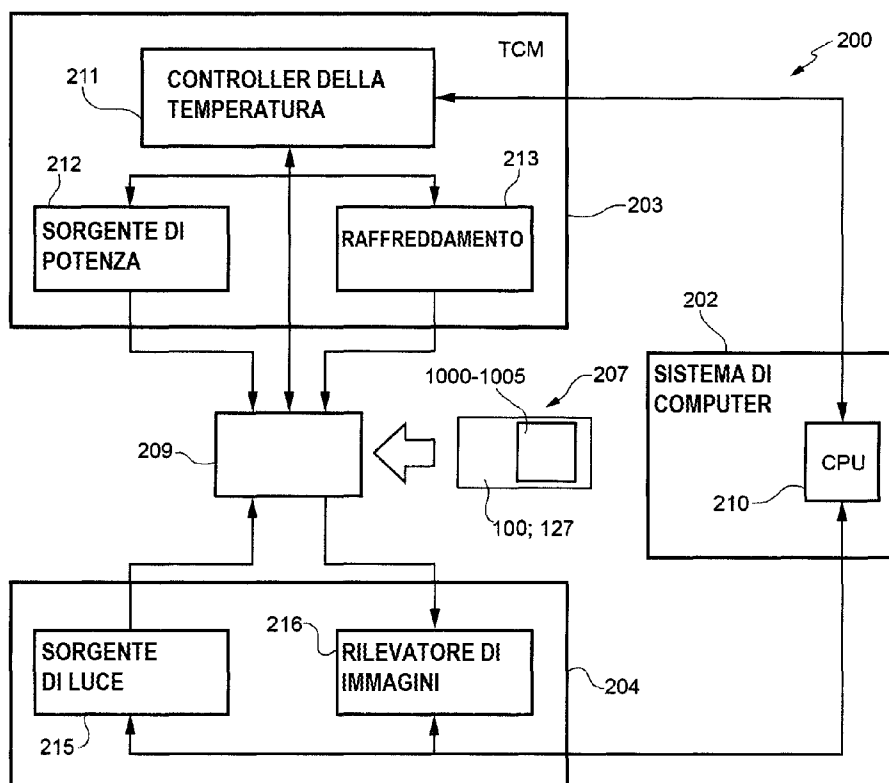


FIG. 23

p.i.: 1) STMICROELECTRONICS S.R.L.
2) BIOMERIEUX S.A.

Simone BERTOLOTTO
(Iscrizione Albo nr. 1422/B)

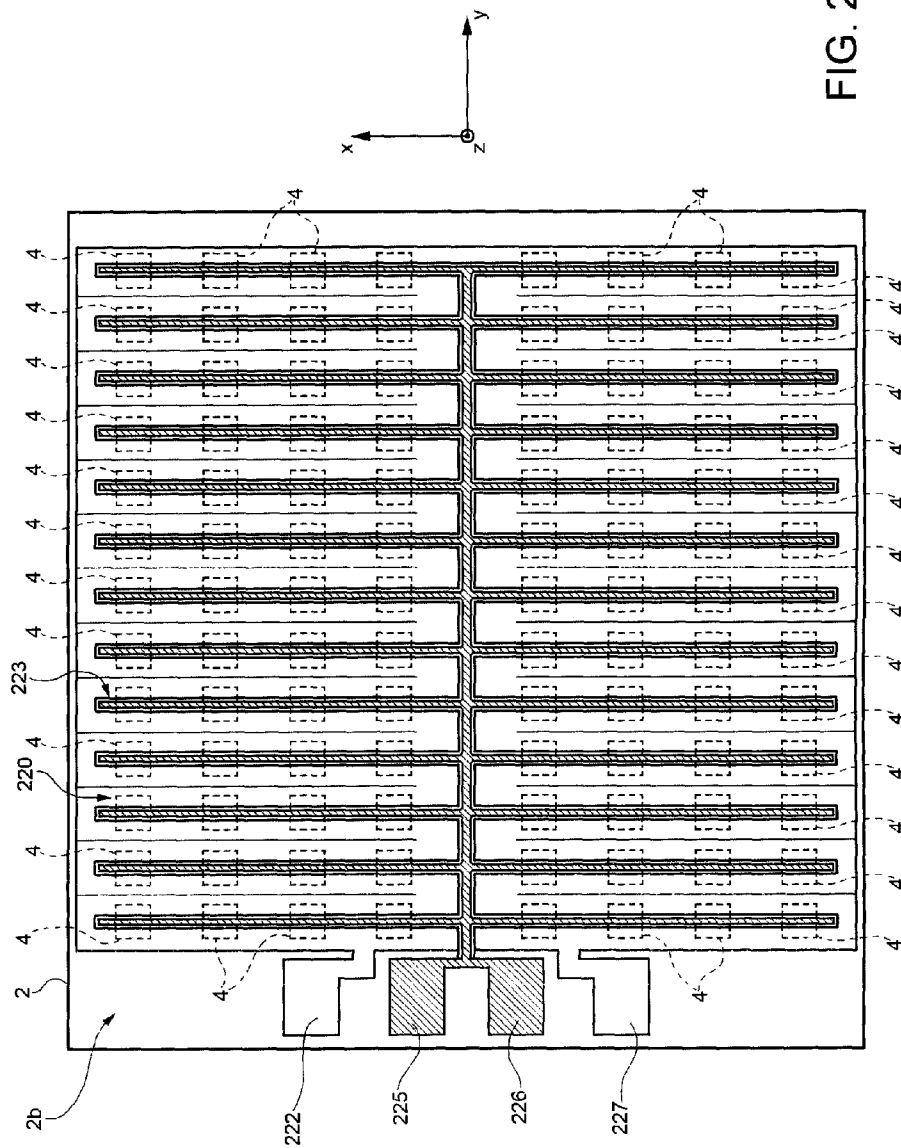


FIG. 24

p.i.: 1) STMICROELECTRONICS S.R.L.
2) BIOMERIEUX S.A.

Simone BERTOLOTTO
(Iscrizione Albo nr. 1422/B)

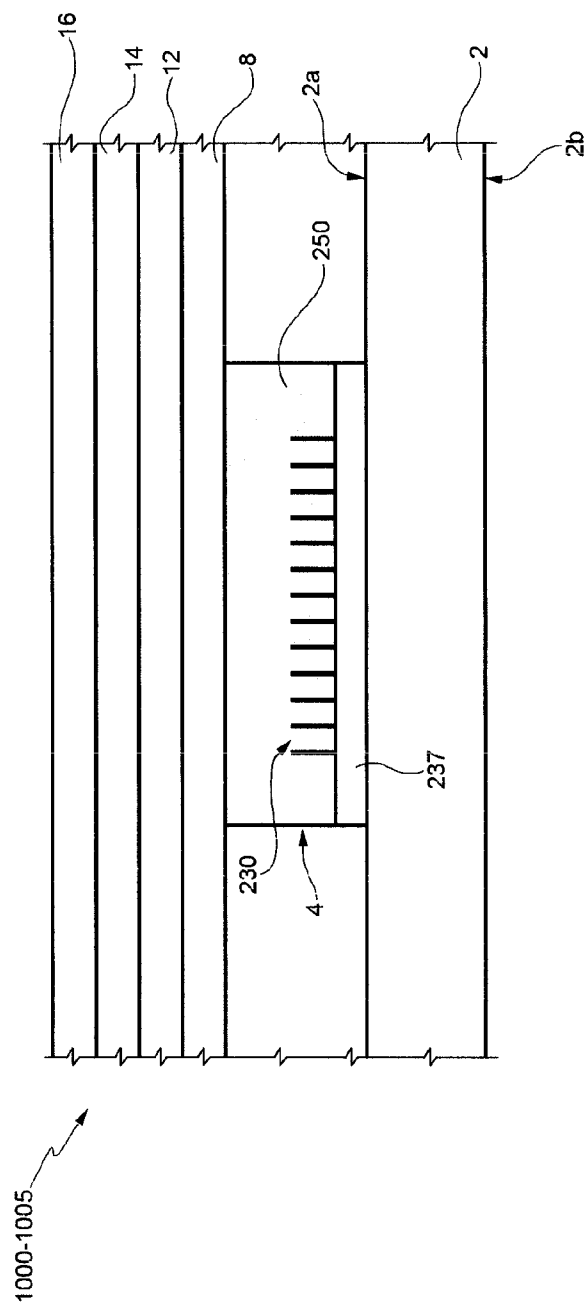
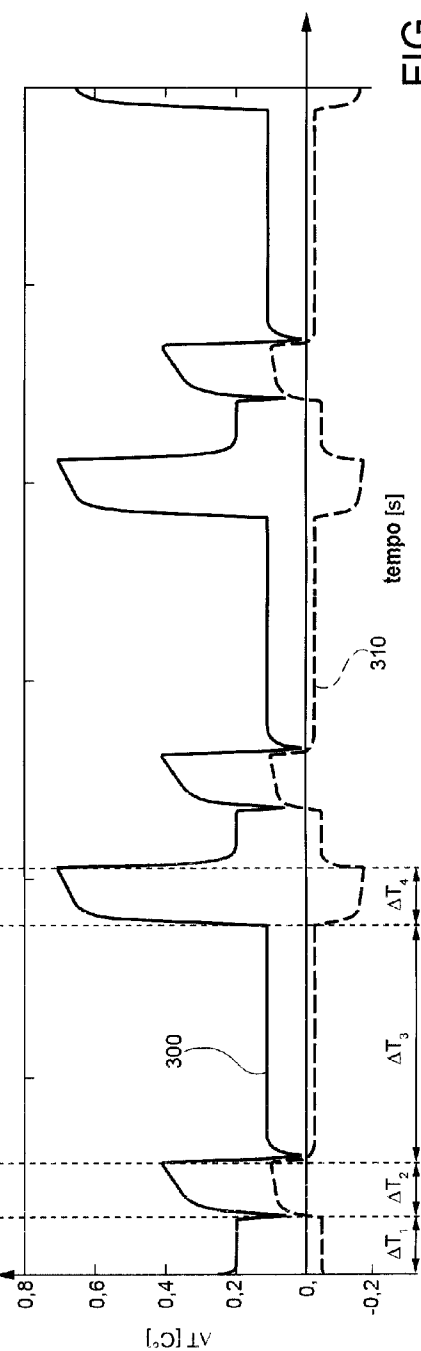
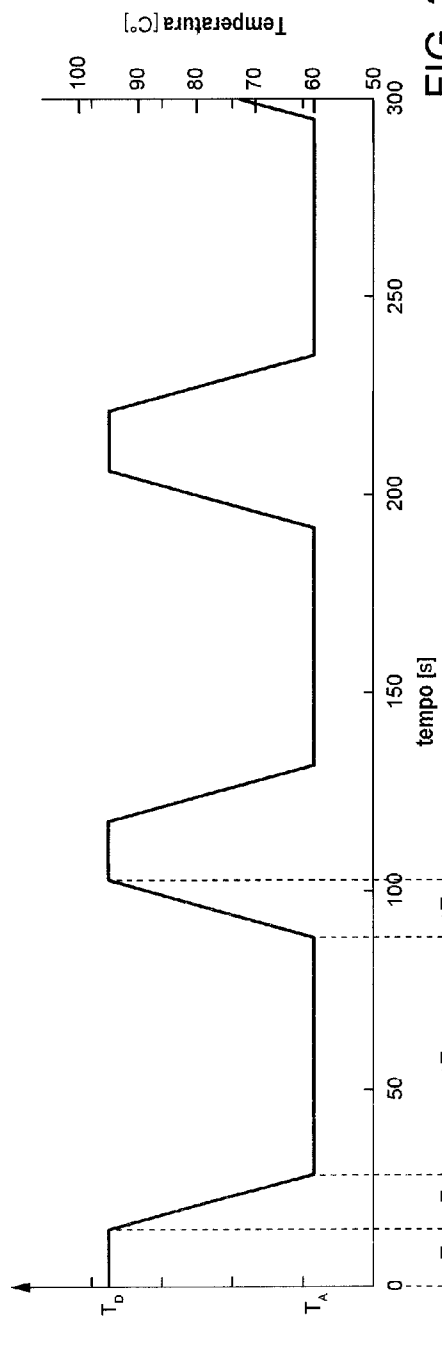


FIG. 25

p.i.: 1) STMICROELECTRONICS S.R.L.
2) BIOMERIEUX S.A.

Simone BERTOLOTTO
(Iscrizione Albo nr. 1422/B)



p.i.: 1) STMICROELECTRONICS S.R.L.
2) BIOMERIEUX S.A.

Simone BERTOLOTTO
(Iscrizione Albo nr. 1422/B)

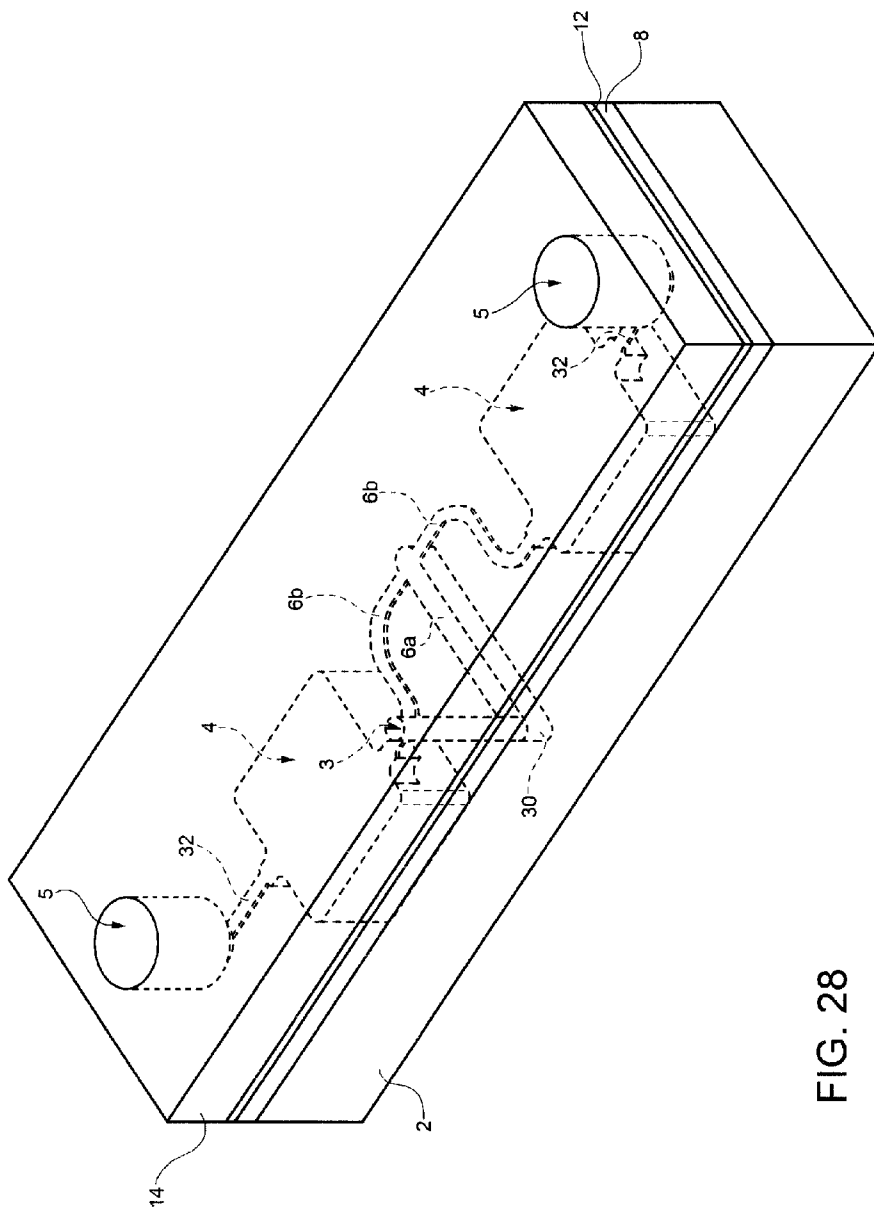


FIG. 28

p.i.: 1) STMICROELECTRONICS S.R.L.
2) BIOMERIEUX S.A.

Simone BERTOLOTTO
(Iscrizione Albo nr. 1422/B)

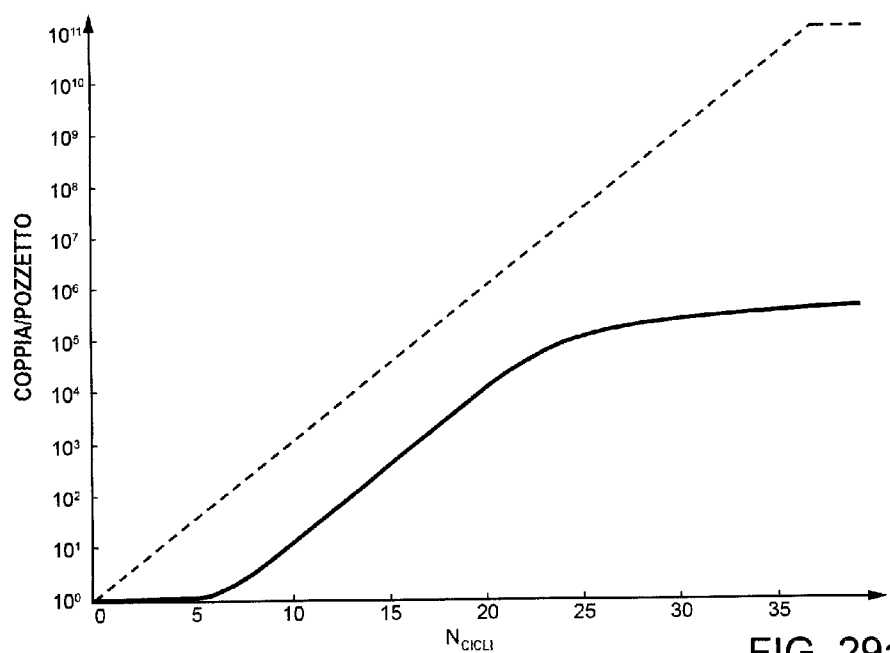


FIG. 29a

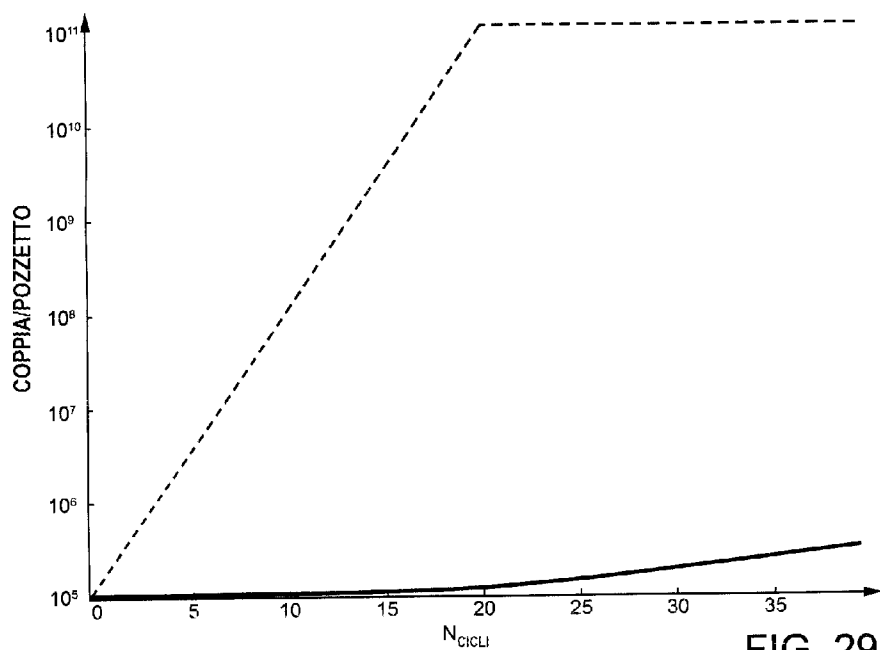
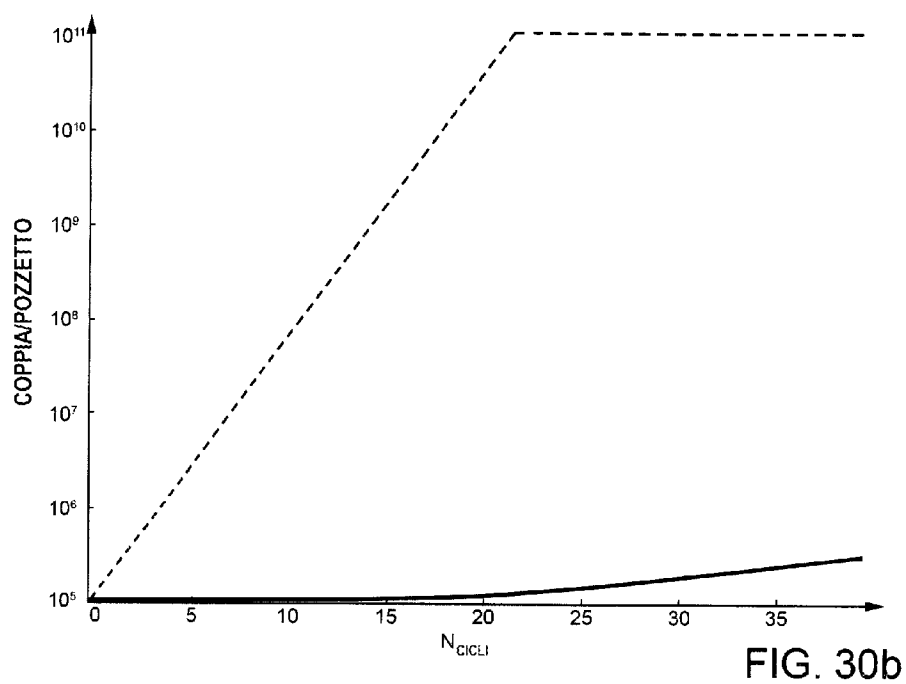
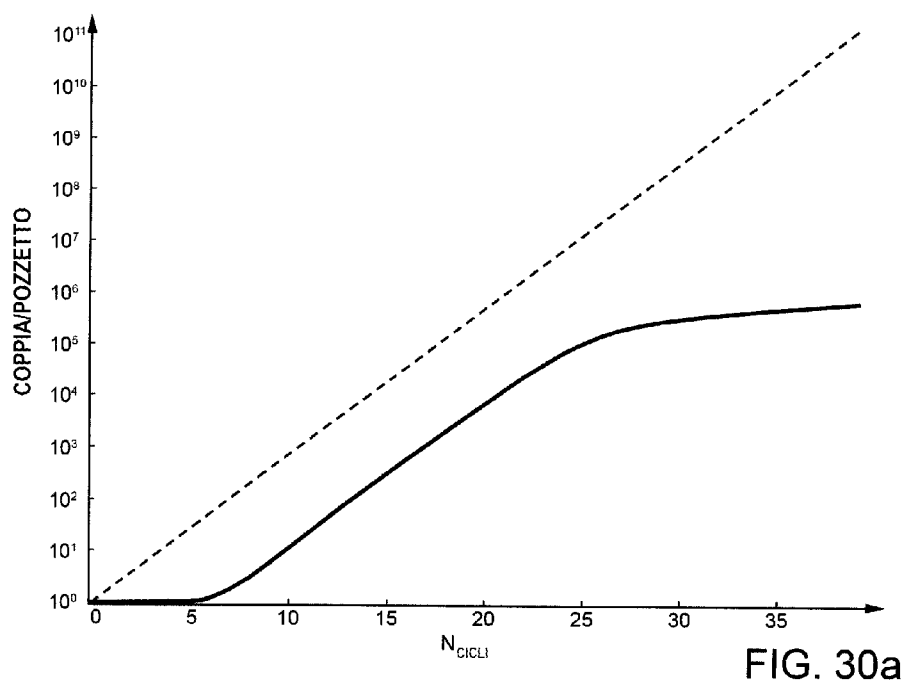


FIG. 29b

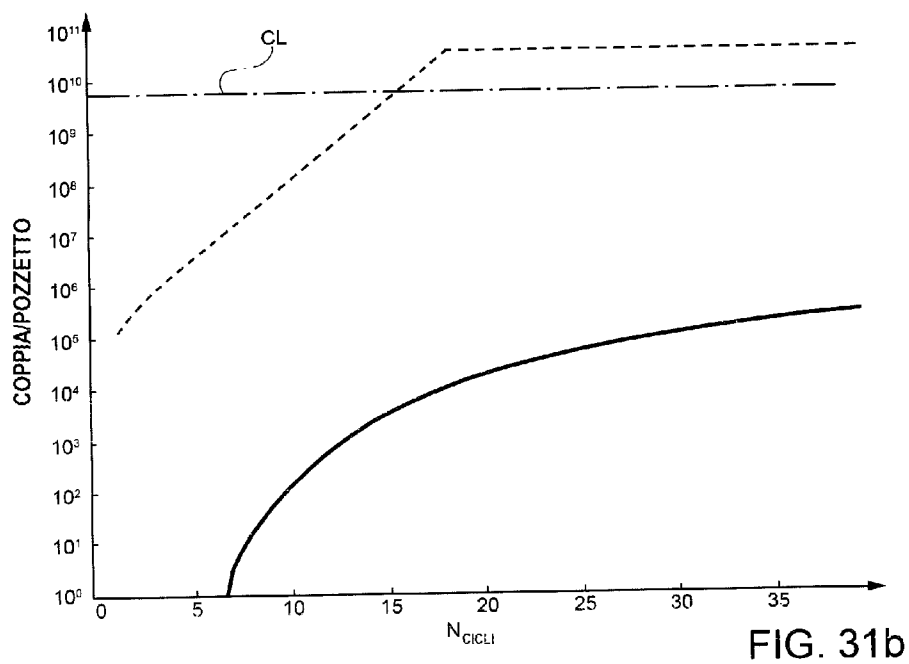
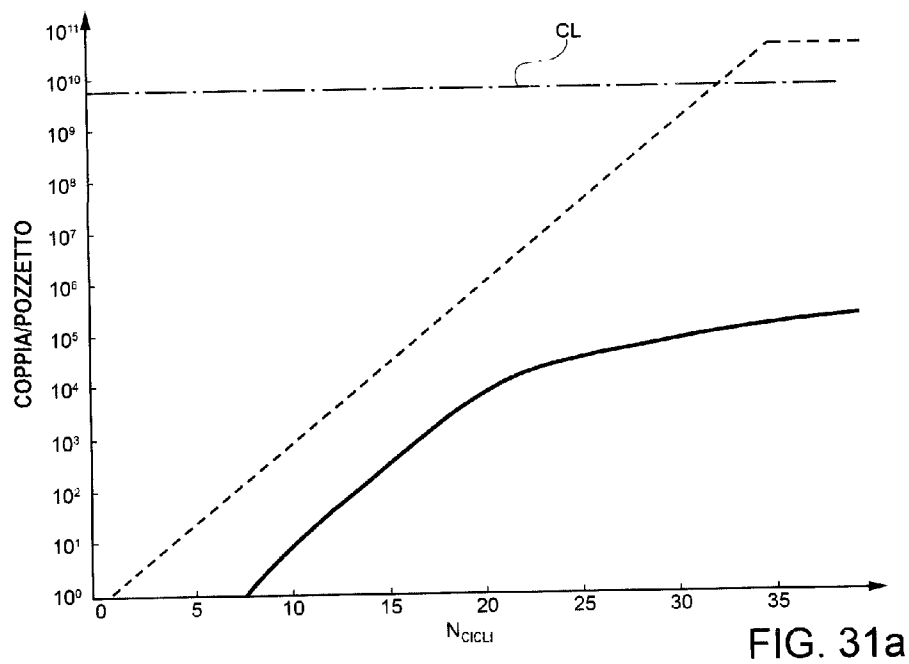
p.i.: 1) STMICROELECTRONICS S.R.L.
2) BIOMERIEUX S.A.

Simone BERTOLOTTO
(Iscrizione Albo nr. 1422/B)



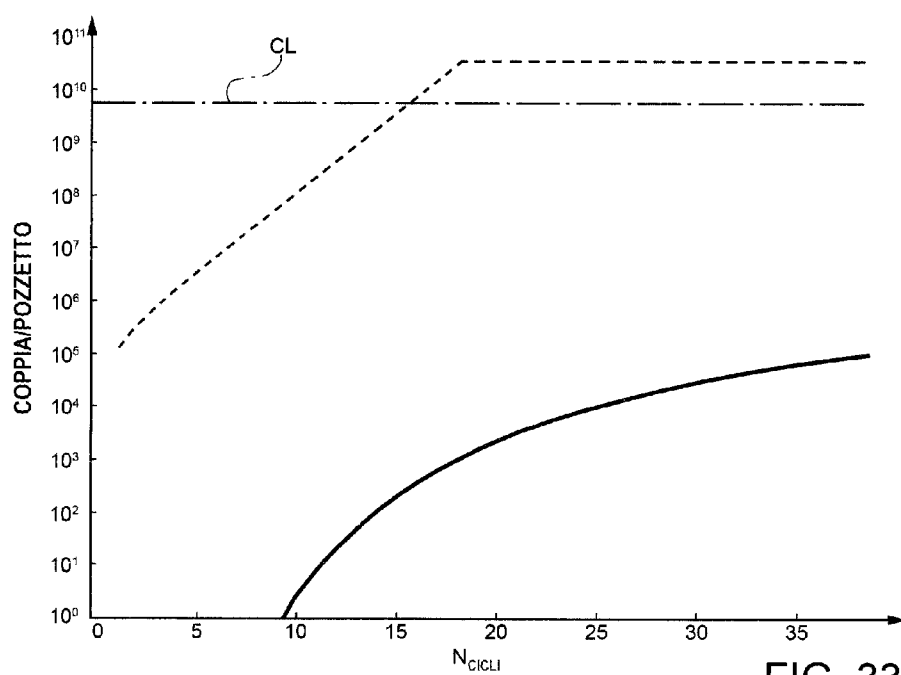
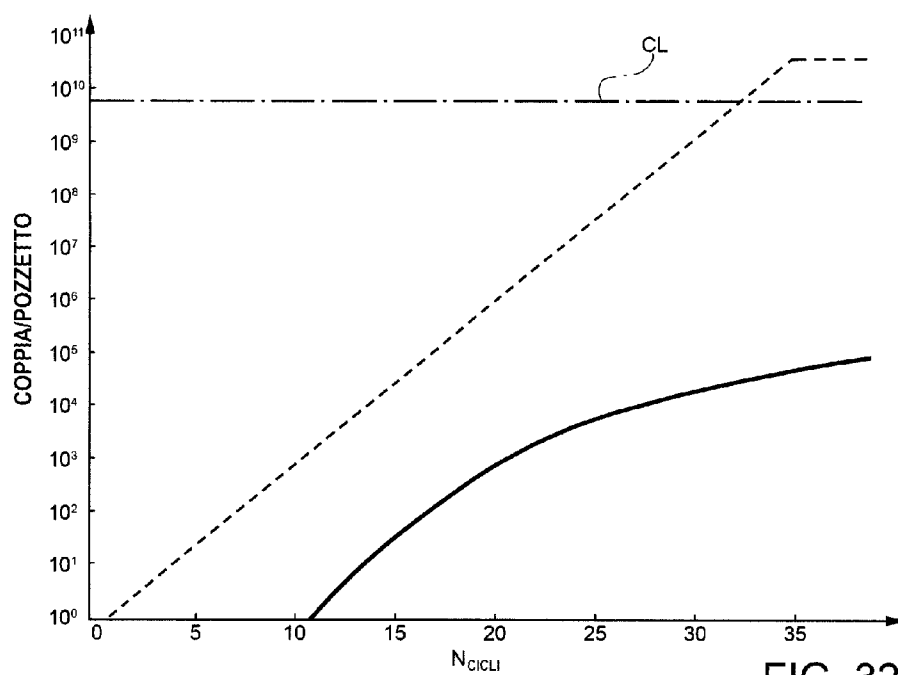
p.i.: 1) STMICROELECTRONICS S.R.L.
2) BIOMERIEUX S.A.

Simone BERTOLOTTO
(Iscrizione Albo nr. 1422/B)



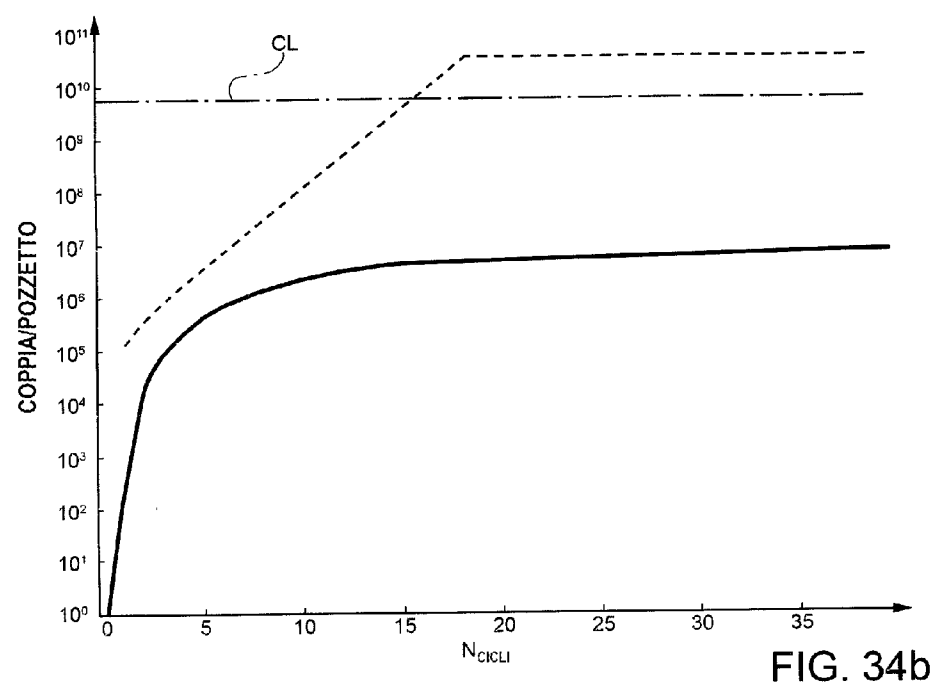
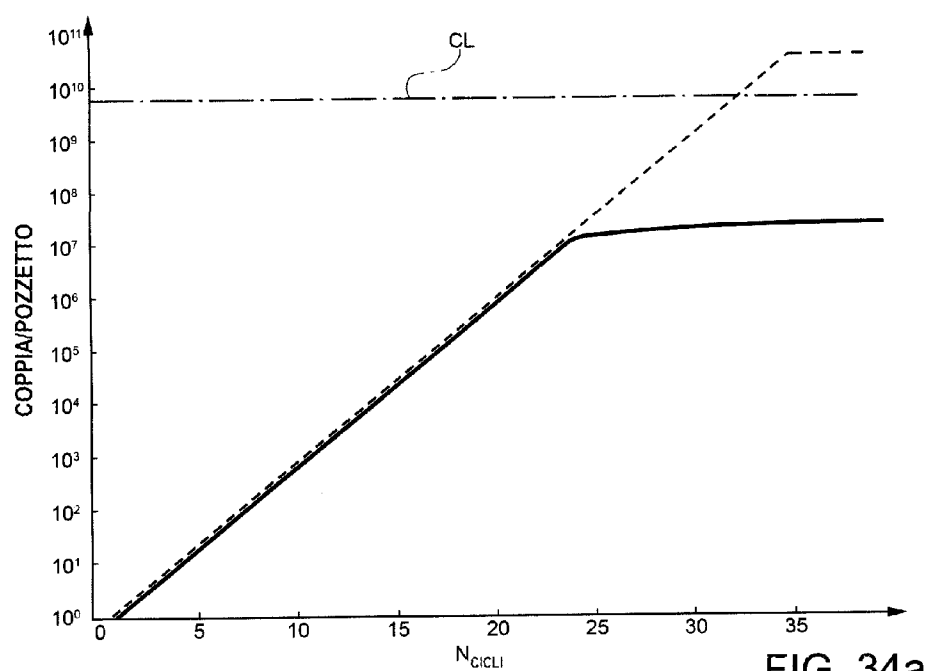
p.i.: 1) STMICROELECTRONICS S.R.L.
2) BIOMERIEUX S.A.

Simone BERTOLOTTO
(Iscrizione Albo nr. 1422/B)



p.i.: 1) STMICROELECTRONICS S.R.L.
2) BIOMERIEUX S.A.

Simone BERTOLOTTO
(Iscrizione Albo nr. 1422/B)



p.i.: 1) STMICROELECTRONICS S.R.L.
2) BIOMERIEUX S.A.

Simone BERTOLOTTO
(Iscrizione Albo nr. 1422/B)