

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: 2002.01.28	(73) Titular(es): QIAGEN SCIENCES, LLC 19300 GERMANTOWN ROAD GERMANTOWN, MD 20874 US
(30) Prioridade(s): 2001.01.26 US 264605 P	
(43) Data de publicação do pedido: 2003.10.22	
(45) Data e BPI da concessão: 2011.08.31 242/2011	(72) Inventor(es): VAROUJ AMIRKHANIAN US MING-SUN LIU US PAUL MOONEY US
	(74) Mandatário: MARIA MANUEL RAMOS LUCAS LARGO DE S. DOMINGOS N.º 1 2910-092 SETÚBAL PT

(54) Epígrafe: **CARTUCHO MULTI-CANAL PARA BIO SEPARAÇÃO**

(57) Resumo:

UM SISTEMA DE BIO SEPARAÇÃO USANDO UM CARTUCHO DE MULTICANAL, EFICIENTE, COMPACTO, PORTÁTIL, INTERCAMBIÁVEL, REUTILIZÁVEL, RECICLÁVEL, TEM INTEGRADO ÓPTICAS PRÉ ALINHADAS E UM RESERVATÓRIO DE REAGENTE INTEGRADO. O CARTUCHO SUPORTA, POR EXEMPLO, MÚLTIPLOS CAPILARES PARA A SEPARAÇÃO CE. UM RESERVATÓRIO INTEGRADO CONTENDO UM MEIO DE SUPORTE DE SEPARAÇÃO (POR EXEMPLO, UM TAMPÃO DE GEL) É COMUM A TODOS OS CAPILARES. A QUÍMICA DO MEIO E AS CARACTERÍSTICAS DOS CAPILARES (POR EXEMPLO, O TAMANHO CAPILAR REVESTIMENTO, E COMPRIMENTO) SÃO DEFINIDOS PARA CADA CARTUCHO. CARTUCHOS DIFERENTES PODEM SER TROCADOS FACILMENTE NO SISTEMA DE BIO SEPARAÇÃO PARA SE ADEQUAR A SEPARAÇÃO DE AMOSTRA EM PARTICULAR COM BASE. O RESERVATÓRIO É ACOPLADO A UMA BOMBA DE PRESSÃO DE AR QUE PRESSURIZA O RESERVATÓRIO DE GEL PARA LIMPAR E PREENCHER OS CAPILARES COM TAMPÃO COMO O MEIO DE APOIO A SEPARAÇÃO. NOUTRO ASPECTO DA PRESENTE INVENÇÃO, ÓPTICA EXIGINDO ALINHAMENTO FINO NO QUE DIZ RESPEITO ÀS ZONAS DE DETECÇÃO (COMO A FIBRA ÓPTICA PARA DIREÇÃO DA RADIAÇÃO INCIDENTE E / OU EMISSÕES DE RADIAÇÃO) ESTÃO INTEGRADOS NO CARTUCHO.

Resumo

Um sistema de bio separação usando um cartucho de multi-canal, eficiente, compacto, portátil, intercambiável, reutilizável, reciclável, tem integrado ópticas pré alinhadas e um reservatório de reagente integrado. O cartucho suporta, por exemplo, múltiplos capilares para a separação CE. Um reservatório integrado contendo um meio de suporte de separação (por exemplo, um tampão de gel) é comum a todos os capilares. A química do meio e as características dos capilares (por exemplo, o tamanho capilar revestimento, e comprimento) são definidos para cada cartucho. Cartuchos diferentes podem ser trocados facilmente no sistema de bio separação para se adequar a separação de amostra em particular com base. O reservatório é acoplado a uma bomba de pressão de ar que pressuriza o reservatório de gel para limpar e preencher os capilares com tampão como o meio de apoio a separação. Noutro aspecto da presente invenção, óptica exigindo alinhamento fino no que diz respeito às zonas de detecção (como a fibra óptica para direção da radiação incidente e / ou emissões de radiação) estão integrados no cartucho.

Descrição

Cartucho multi-canal para bio separação

Antecedentes da Invenção

Referência cruzada

É feita referência à Patente americana nº. 2002 113213 intitulada "Detecção Ótica num Sistema de Bio Separação com Múltiplos Canais", concomitantemente arquivada em 28 de Janeiro de 2002 (Súmula do Solicitador Nº.: 1031/ 209), que é ordinariamente atribuída a BioCal Technology, Inc, o cessionário da presente invenção.

Campo da Invenção

A presente invenção refere-se à bio separação, e mais em particular, a um cartucho para o apoio de colunas de separações múltiplas com ótica de detecção integrada e um reservatório reagente, assim como um sistema de bio separação que integra um cartucho.

Descrição da Técnica Relacionada

A bioanálise, tal como a análise de ADN, está rapidamente a fazer a transição de uma busca puramente científica de rigor, para um procedimento de rotina com dependência acrescida e provada. Os pesquisadores clínicos, farmacêuticos e investigadores forenses, todos usam análises de ADN na realização das suas tarefas. No entanto, devido à complexidade do equipamento que deteta e mede as amostras de ADN e à dificuldade em preparar as amostras, os procedimentos das análises de ADN existentes são frequentemente demoradas e dispendiosos. É, por isso, desejável reduzir o tamanho, o número de partes e o custo do equipamento, de modo a facilitar o manuseamento das amostras durante o processo e, em geral, ter um detetor de baixo custo e de grande sensibilidade.

Um tipo de instrumento para a análise de ADN separa as moléculas de ADN através de eletroforese. As técnicas de eletroforese podem ser usadas para separar fragmentos de ADN para aplicações de genotipagem, incluindo testes de identidade humana, análise de expressão, deteção de patógenos, deteção de mutações e estudos farmacológicos. O termo eletroforese refere-se ao movimento de uma molécula carregada sob a influência de um campo elétrico. A eletroforese pode ser usada para separar moléculas que têm rácios de carga na massa equivalentes, mas massas diferentes. Os fragmentos de ADN são um exemplo dessas moléculas.

Há uma variedade de instrumentos disponíveis comercialmente que aplicam a eletroforese na análise de amostras de ADN. Um desses tipos é um instrumento de eletroforese de placa de gel de várias faixas que, tal como o nome sugere, usa

uma placa de gel na qual se colocam as amostras de ADN. São aplicadas cargas elétricas na placa de gel, o que faz com que a amostra de ADN se separe em fragmentos de ADN com diferentes massas.

Um outro tipo de instrumento de eletroforese é o instrumento de eletroforese capilar (CE). Ao aplicar-se eletroforese numa coluna capilar fundida, com uma solução de tampão, o tamanho de amostra necessária é significativamente menor e a velocidade da separação e resolução podem ser aumentadas várias vezes, quando comparado com o método de eletroforese de placa de gel. Estes fragmentos de ADN em CE são frequentemente detetados pela direção da luz através da parede capilar, nos componentes que se separam da amostra que foi marcada com um material fluorescente, e na deteção de emissões fluorescentes induzidas pela luz incidente. As intensidades da emissão são representativas da concentração, quantidade e/ ou tamanho dos componentes da amostra. No passado, os métodos de deteção com fluorescência de laser induzido (LIF) foram desenvolvidos para instrumentos CE. A deteção fluorescente é frequentemente o método de deteção de escolha nos campos da genómica e proteómica, devido à sua excelente sensibilidade, quando comparado com outros métodos de deteção.

Alguns dos desafios na conceção de instrumentos baseados em CE e protocolos de análise CE, prendem-se com as técnicas de deteção de amostras. No caso da deteção fluorescente, já tinham sido dadas considerações de conceções consideráveis a, por exemplo, fontes de radiação, deteção ótica, sensibilidade e segurança da deteção, custos e segurança na

estrutura das óticas desejadas. No passado, era necessária uma fonte de luz relativamente potente, tal como um laser. Quando a luz é direcionada através da parede capilar nos componentes da amostra separados no diâmetro capilar, a luz espalha-se no exterior da parede capilar /interface do ar e o interior da parede capilar/ interface do buffer (dispersão Raman), o que obscurece ou corrompe a intensidade da emissão fluorescente. Do mesmo modo, as emissões fluorescentes espalham-se nos interfaces da parede. No passado, foram desenvolvidas várias técnicas para se recolher de forma mais completa as emissões fluorescentes, para melhorar a intensidade do sinal e assim, também a sensibilidade da deteção. Estas técnicas envolvem outros componentes móveis e não móveis que se vêm juntar à relativa complexidade e ao custo da preparação da deteção.

As limitações do modelo dos instrumentos de eletroforese da técnica anterior são exacerbadas no que respeita ao desenvolvimento de instrumentos multicapilares à base de CE. Por exemplo, a deteção fluorescente induzida por laser de scanner confocal (LIF) já foi adotada em inúmeros sistemas de eletroforese multicapilar. A deteção confocal baseia-se num sistema de ótica de scanning. O uso de partes móveis não é ideal quando se tem em consideração a simplicidade, a robustez e o baixo custo do instrumento. Além disso, a pouca profundidade de focagem da objetiva do microscópio para o detetor confocal coloca severas exigências nas tolerâncias dos componentes mecânicos e óticos. Além disso, o método de scanning ótico geralmente envolve um ciclo de trabalho mais demorado por cada capilar. Por isso, se o instrumento tiver uma escala, de modo a gerar um maior rendimento, a sensibilidade do

sistema pode ficar comprometida. Outro método de detecção é a detecção Sheath Flow. A principal desvantagem do detetor de fluxo de bainha é o sistema de fluxo altamente sofisticado que é necessário para assegurar um fluxo de bainha com um mínimo de linhas cruzadas óticas entre os canais. São feitas grandes exigências nas tolerâncias dos componentes óticos e mecânicos, de modo a conseguir-se as exigências de robustez para os utilizadores finais. A sensibilidade do dispositivo é muito boa mas não é óbvio que este princípio da detecção fluorescente sirva para uma análise de ADN com um rendimento alto mas com baixo custo.

Outros desafios na conceção de instrumentos multicapilares à base de CE relacionaram-se com o apoio dos capilares. A Patente Americana nº 5 198 091 de Burolla et al. descreve um cartuxo capilar para a eletroforese que emprega uma grande linha de matrizes capilares. Esta patente pode incluir um espaço oco definido na área capilar para o fluído de arrefecimento circular mas não inclui um reservatório como parte integrante do cartuxo. A Patente Americana nº 5 413 686 de Klein et al. descreve um analisador de eletroforese capilar com vários canais que inclui vários capilares. São ilustrados reservatórios no dispositivo de análise, mas são reservatórios múltiplos e estão separados dos capilares, e não integrados num apoio capilar. Também estão ilustrados óticas de detecção, mas não estão integradas num compacto de apoio capilar. A Patente Americana nº 5 338 427 de Shartle et al. descreve um cartuxo de separação de utilização única para um instrumento de eletroforese capilar, no qual os tubos capilares estão colocados horizontalmente numa matriz coplanar. O cartuxo de separação de utilização única

substitui os grandes reservatórios de reagentes com gotas hemisféricas de reagente.

Além disso, os sistemas atuais para a química de tampão de gel não permitem usar o instrumento CE que é específico com as aplicações. Por outras palavras, os atuais instrumentos CE requerem uma correspondência capilar (com diferentes revestimentos e tamanhos de colunas) com o reagente tampão para diferentes aplicações de separação (diferentes tipos, velocidades, resoluções).

Por outro lado, a Patente americana 5 916 428 descreve um sistema de eletroforese automático. O sistema emprega um cartucho capilar com uma polaridade de tubos capilares. O cartucho tem uma primeira matriz de extremidades capilares que se projetam de um lado do prato. A primeira matriz de extremidades capilares está afastada substancialmente da mesma maneira que as aberturas de um tabuleiro de micro trituração de tamanho standard. Isto permite realizar-se simultaneamente eletroforese capilar em amostras, presentes em cada uma das aberturas do tabuleiro. O cartucho capilar tem duas realizações. Numa realização, as segundas extremidades dos tubos capilares estão também organizadas numa matriz dessas. Na segunda realização, as segundas extremidades comunicam com uma cavidade interior de células de pressão, onde se podem introduzir soluções, géis e outros semelhantes. A célula de pressão permite a aplicação de pressão alta na limpeza dos tubos capilares. É ainda descrito um dispositivo para a realização de eletroforese de géis capilares automática que utiliza esses cartuchos.

Resumo da Invenção

A presente invenção fornece um sistema de bio separação que usa um cartucho de vários canais fácil de montar, reciclável, de baixo custo, reutilizável, substituível, portátil, simplificado, compacto e eficiente, sem partes móveis para a bio separação, e que tem óticas integradas préalinhadas, assim como um reservatório reagente integrado. O cartucho leva, por exemplo, múltiplos capilares para separação CE. O reservatório CE, que contém um meio de apoio de separação (por exemplo, um tampão de gel), é comum a todos os capilares. A química do meio e as características dos capilares (por exemplo, o tamanho do capilar, o revestimento e o comprimento) são definidos para cada cartucho. Diferentes cartuchos podem ser trocados no sistema de bio separação para se adequar a cada separação baseada na amostra. O reservatório está ligado a uma bomba de pressão de ar que pressuriza o reservatório de gel para limpar e encher os capilares com um tampão, como meio de apoio à separação. De acordo com a presente invenção, as óticas que necessitam de um alinhamento preciso, no que respeita às zonas de deteção (tais como óticas de fibra para direccionar a radiação incidente ou emissões de radiação) estão integradas no cartucho.

De acordo com a presente invenção, o cartucho suporta vários capilares para a separação CE. O cartucho inclui partes do corpo montadas, fibras por excitação, capilares, eléctrodos, um reservatório buffer/ de gel, uma ótica integrada para a entrada de radiação externa. O reservatório está equipado com um único eléctrodo comum a todos os capilares.

Na presente invenção, o sistema ótico por excitação está integrado no cartucho. O sistema por excitação inclui direcionar a luz por excitação através de fibras por excitação para a zona de detecção através da ligação de LEDs com lentes de micro bolas. As fibras por excitação estão ligadas a uma ranhura em forma de V, adjacente a cada capilar.

Num outro aspeto da presente invenção, a presente invenção fornece um instrumento de bio separação que inclui o cartucho de bio separação com vários canais da presente invenção.

BREVE DESCRIÇÃO DAS ILUSTRAÇÕES

Para uma compreensão mais completa da natureza e das vantagens da invenção, assim como do modo preferido, deverá ser feita referência à seguinte descrição em pormenor, lida juntamente com as ilustrações que a acompanham. Nas seguintes ilustrações, os mesmos numerais de referência designam partes iguais ou semelhantes através das ilustrações.

A FIG. 1 é uma vista esquemática de um sistema eletroforese capilar que inclui a presente invenção.

A FIG. 2 é uma vista em perspetiva do sistema/ máquina eletroforese capilar, de acordo com uma realização da presente invenção.

A FIG. 3 é um diagrama do sistema de controlo.

A FIG. 4 é uma vista em perspetiva da secção inferior do cartucho com fibras por excitação.

A FIG. 5 é uma vista em perspetiva da secção do meio do cartucho e da secção inferior com fibras por excitação antes de estar ligado.

A FIG. 6 é uma vista em perspetiva da secção do meio do cartucho e da secção inferior com fibras por excitação depois de estar ligado.

A FIG. 7 é uma vista da frente em perspetiva da secção do meio do cartucho junto com a secção inferior da FIG. 6 com capilares antes de estarem ligadas.

A FIG. 8 é uma vista da frente em perspetiva da secção do meio do cartucho e da secção inferior com capilares depois de estarem ligadas.

A FIG. 9 é uma vista da parte de trás em perspetiva da secção do meio do cartucho e da secção inferior com um reservatório de gel.

A FIG. 10 é uma vista da frente em perspetiva da secção do meio do cartucho e da secção inferior com um reservatório de gel e as tampas da frente e de trás.

A Fig. 11 é uma vista em perspetiva da parte da frente do cartucho com ótica de deteção incluída.

A FIG. 12 é uma vista seccional em perspetiva da parte da frente do cartucho na FIG. 11 com o sistema ótico por excitação e de emissão.

A FIG. 13 é uma vista seccional em perspetiva do cartucho com o esquema do sistema detetor.

A FIG. 14 é uma vista seccional em perspetiva da parte da frente do cartucho com o sistema ótico por excitação e de emissão.

A FIG. 15 é uma vista aumentada da secção A na FIG. 14 e uma vista seccional em perspetiva da secção A do cartucho na FIG. 13.

A FIG. 16 é uma vista seccional em perspetiva da secção B do cartucho ilustrado na FIG. 13.

A FIG. 17 é uma vista seccional em perspetiva da zona de deteção com lentes, sonda, capilares e fibra por excitação.

DESCRIÇÃO EM PORMENOR DAS REALIZAÇÕES PREFERIDAS

Esta invenção é descrita a seguir em referência a várias realizações, com referência aos números. Enquanto esta invenção é descrita em termos do melhor modo para se alcançar os objetivos da invenção, será tido em conta pelos peritos nesta arte que podem ser feitas variações baseadas nestes ensinamentos, sem se desviarem do espírito ou do âmbito da invenção.

A presente invenção é direcionada para um novo sistema CE e uma nova configuração de cartucho, no qual a radiação incidente (por exemplo, de um laser ou de uma fonte LED) para a deteção de analitos separados é direcionada através das paredes de divisão da zona de deteção ou da coluna de separação. Com o objetivo de ilustrar os princípios da presente invenção e não limitá-la, a presente invenção é descrita com referência a realizações direcionadas para a eletroforese capilar e a fluorescência induzida de radiação.

Com referência à FIG. 1, um sistema de bio separação, mais especificamente um sistema de eletroforese capilar (CE) 200 que inclui a presente invenção, está ilustrado esquematicamente. O sistema CE 200 compreende geralmente uma coluna de separação capilar 22 (por exemplo, 100 - 500 μm O. D.), que define um canal de separação 36 (por

exemplo, 25 - 200 μm I. D.) A coluna capilar 22 pode ser feita de sílica fundida, vidro, poliamida, ou outros materiais plásticos/ de cerâmica/ de vidro. As paredes interiores da coluna de separação 22 (isto é, as paredes do canal de separação 36) podem ser revestidas com um material que pode acumular uma carga electrostática para facilitar a eletroforese e/ ou a migração electrónica dos componentes da amostra. O canal de separação 36 é preenchido por um meio de apoio de separação que pode simplesmente fazer funcionar um tampão ou a peneiração de matriz de gel conhecida na técnica. Para a detecção da fluorescência induzida por radiação, a matriz de gel inclui um fluoróforo conhecido, como brometo de etídio.

Uma extremidade da coluna capilar 22 é submersa num reservatório 28 com tampão/ gel corrente. A outra extremidade da coluna capilar 22 é ligada ao frasco da amostra 26. Entenda-se que as configurações de detecção ilustradas nas outras realizações podem ser igualmente implementadas num sistema semelhante ao sistema CE 20. Além disso, o canal de separação 36 pode ser um capilar direito ou um microcanal com uma secção da janela de detecção mais próxima do reservatório de gel na saída como zona de detecção, o que constitui o modo preferido atual da nossa invenção. Um detetor de radiação 24 está posicionado por fora de uma secção transparente das paredes capilares na zona de detecção 30. Uma fibra por excitação 16 estende-se de uma fonte de radiação 18 (por exemplo, LED ou laser) e é direcionada para a zona de detecção 30 no lado de fora das paredes da coluna. Os eléctrodos 12 e 14, que fazem parte do conjunto do cartucho, estão ligados aos reservatórios do tampão 26 e ao reservatório de gel 28 para completarem o caminho da eletroforese.

Por uma questão de exaustividade, é suficiente mencionar de forma breve o funcionamento do sistema CE 200. Em funcionamento, uma amostra biológica preparada (por exemplo, uma amostra de ADN) diretamente da máquina de Reação em Cadeia Polimerase (PCR) é introduzida na extremidade mais distante da coluna capilar, longe da zona de deteção por diversas maneiras que não fazem parte da presente invenção (por exemplo, injeção eletrocinética de um reservatório da amostra ou injeção de pressão física, usando-se uma bomba de seringa). A amostra liga-se ao fluoróforo.

Quando um potencial DC (por exemplo, 1 - 30 KV) é aplicado entre os elétrodos 12 e 14, a amostra migra sob o potencial elétrico aplicado ao longo do canal de separação 36 (por exemplo, o ADN que tem carga negativa viaja através do gel peneirado com uma matriz/ fluoróforo corante integrado, em direção a um eletrodo positivo, tal como está ilustrado na FIG. 1) e separa-se em faixas de componentes da amostra. A extensão da separação e da distância percorrida ao longo do canal de separação 36 depende de vários fatores, tais como a mobilidade de migração dos componentes da amostra, a massa e tamanho ou comprimento dos componentes da amostra, e o meio de apoio à separação. As forças condutoras no canal de separação 36 para a separação das amostras poderão ser eletroforéticas, de pressão ou um meio de corrente eletrosmótica (EOF).

Quando a amostra chega à zona de deteção, a radiação por excitação é direcionada através da fibra por excitação 16 na zona de deteção. Os componentes da amostra tornam-se

fluorescentes, com intensidades proporcionais às concentrações dos respetivos componentes da amostra (proporcional à quantidade de material tag). O detetor 24 deteta as intensidades da fluorescência emitida numa força de onda diferente daquela da radiação incidente. A radiação emitida e detetada pode ser analisada por métodos conhecidos. Para um sistema automático, um controlador 32 controla as operações do sistema CE 200.

CARTUCHO CAPILAR MÚLTIPLO À BASE DO SISTEMA CE

A matriz capilar com múltiplos canais inclui doze zonas de deteção definidas por micro canais 36 num corpo do cartucho (ver também a FIG. 2). O corpo do cartucho de substrato pode ser maquinado, termo formado, foto gravado ou moldado a injeção (por exemplo, Acrílico, PET, Ultem, Glastic, Fluorosint ou qualquer plástico transparente ótico) para suportar a matriz capilar com múltiplos canais nas ranhuras alinhadas em forma de V óticas integradas. O cartucho da presente invenção inclui uma matriz capilar de sílica fundida com doze canais (16 cm de comprimento) que é usada para a separação e deteção das amostras como parte de um conjunto de cartucho descartável. Quando o cartucho é ligado ao sistema CE, para o qual ele foi concebido para ser usado, as fibras por excitação (isto é, a sílica de vários modos ou as fibras de plástico, 0,22 NA) que estão integradas nos micro canais 36 são direccionadas para a zona de deteção 30. Cada canal é ligado a um LED. A luz do LED é lançada para o lado dos capilares 36. Nesta realização em particular, o gel peneirado preenche a matriz 36 capilar/ de multicanais.

A FIG. 2 ilustra o projeto de um cartucho com vários canais 100 instalado num sistema CE 200 de acordo com uma realização da presente invenção, que fornece um manuseamento fácil das colunas de separação com vários canais e permite uma ligação ótica fácil das zonas de deteção às óticas de deteção do instrumento CE. A FIG. 2 ilustra uma vista geral em perspetiva do instrumento CE 200 (analisador de ADN) com o cartucho de 12 capilares no lugar. O instrumento de análise de ADN automático 200 tem uma base 74 que suporta um mecanismo de tabuleiro 80 para o manuseamento de uma amostra modular X- Z, que faz mover dois pratos 70 e 72 microtitulação com 96 poços, em relação ao cartucho multicapilar 100 apoiado no suporte de apoio 164. O sistema 200 fornece um manuseamento fácil das colunas de separação com multicanais e permite uma ligação ótica fácil das zonas de deteção às óticas de deteção do instrumento CE 200.

O cartucho 100 está descrito em maior pormenor a seguir. Em resumo, o cartucho 100 inclui uma matriz capilar de sílica fundida com doze canais que é usada para a separação e deteção das amostras, como parte de um conjunto de cartucho descartável e/ ou portátil e substituível 100. A matriz capilar com multicanais inclui doze zonas de deteção definidas por micro canais no cartucho 100. O cartucho de multicanais 100 ilustrado na FIG. 2 aguenta até 12 capilares 140, com 12 - 16 cm de comprimento. O cartucho com multicanais 100 está integrado com um reservatório tampão de saída 124 no cimo, comum a todos os capilares 140, que está diretamente ligado a uma bomba de pressão de ar modular 78. A bomba de pressão 78 fornece a pressão de ar necessária para encher os doze capilares com o gel peneirado contido no reservatório 124 e para purgar o gel

do funcionamento anterior, dos capilares durante o processo de reenchimento. Dependentemente da viscosidade do gel, podem aplicar-se pressões até 275 - 79 kPa (40 PSI) aos capilares 140, através do reservatório cheio de gel 124. O reservatório de gel 124 está equipado com um eletrodo comum incorporado (ânodo; não ilustrado) para os doze capilares, que está ligado de forma automática a uma fonte de energia de alta voltagem 76 para a eletroforese quando instalado dentro do instrumento 200. Uma ventoinha ou refrigerador Peltier na estrutura adjacente do cartucho 100 fornece um controle da temperatura do cartucho. O cartucho terá aberturas de ventilação (entrada e saída) para a circulação do ar (ar de temperatura controlada a ser introduzido no cartucho a partir do lado do instrumento). Uma fonte de energia 66 fornece energia DC ao sistema CE 200.

Um diagrama de blocos do controlador 32 para o sistema CE 200 está ilustrado na FIG. 3. O controlador compreende um CPU 910, um conversor A/ D 912 para a conversão de sinais de detecção a partir do PMT 178 (FIG. 13) para sinais digitais correspondentes, e um interface I/ O 914 para a transferência e recepção de sinais de e para as partes respectivas do instrumento CE 200 com instruções a partir do CPU 910. Um controlador da temperatura 916 controla a ventoinha ou o refrigerador Peltier 63 que controla a temperatura da câmara de eletroforese para o cartucho de matriz capilar/ microcanais 100. O interface I/ O 914 fica ligado ao controlador de temperatura 916 que também controla a fonte de energia de alta voltagem 76 para uma injeção da amostra e as funções de eletroforese do instrumento CE 200, um circuito 921 para a modulação da fonte de radiação por excitação (por exemplo, LEDs), sensores, bomba de ar, válvula do ar, e motores para a fase

X - Z do instrumento CE 200. O CPU 910 pode estar ainda ligado a um computador pessoal externo 918 que, por seu lado, realiza processamento de dados ou tem uma função de controlo adicional para o sistema CE 200. O CPU 210 e/ ou o CPU 218 pode ser programado com funções de controlo ditadas pelo software Lab VIEW [™] disponível na National Instruments Corporation, para controlar várias características e funções do analisador de ADN com multicanais 200.

Os componentes do controlador 32, com exceção do PC 218, podem ser embalados como um quadro eletrónico 64 (FIG. 2) e a ventoinha de arrefecimento 62 junto com o sistema CE 200 e ligado de forma elétrica ao PC 218 através de uma porta em matriz (não ilustrada), ou podem fazer parte de um módulo controlador em separado por fora do sistema CE 200. O CPU 210 e/ ou o PC 218 estão programados para conseguirem as várias funções e características de controlo para o sistema CE 200. O PC 218 pode ser configurado para fornecer o controlo do painel da frente (isto é, interface do utilizador) para o instrumento 200, e o quadro 64 pode ser configurado para fornecer os controlos de deteção do tempo escalonado/ tempo complexo. Está dentro do âmbito dos conhecimentos de um perito nesta técnica, implementar o código do programa, com as funções e instruções aqui fornecidas para o instrumento 200.

Consegue-se a injeção das amostras através de métodos eletrónicos. A fonte de energia de alta voltagem 76 é usada para fornecer entre 0 e 20 KV de campo elétrico aos capilares de gel para a injeção eletrocinética e as separações de fragmentos de ADN. A energia de luz em banda larga de cada um dos LEDs (FWHM = 47 nm) é fornecida por

fibras óticas de transmissão de luz individual (sílica de códigos múltiplos ou fibras Core micron de plástico 200, 0,22 N. A.) para a cada uma das zonas de detecção capilar dentro do cartucho 100 para impulsionar os fragmentos de ADN separados.

Em funcionamento, o mecanismo de transporte do tabuleiro manuseador de ADN 80, com um prato de 96 poços (8 x 12), é usado para introduzir as amostras de ADN ampliadas (ou analitos) para cada canal de microdiâmetro 36. Dentro dos microcanais 36 estão tubagens 22 revestidas a poliamido ou com capilares de vidro com um diâmetro interior menor (25 - 100 μm) usadas como colunas de separação. O mecanismo de transporte X - Z 80 indexa uma fila de amostras com poços sob a fila de extremidades capilares e mergulhar as extremidades no poço. Ao aplicar-se uma voltagem, a injeção eletrocinética faz mover uma quantidade conhecida de amostra de ADN para o início da coluna de separação 140. Após a injeção, as amostras de ADN do tabuleiro de amostra 72 podem ser substituídas por um tampão em movimento do tabuleiro 70. Como alternativa, após a injeção, o mecanismo de transporte 80 pode indexar-se para fazer mover uma fila de 12 poços que contêm amostras de ADN. Ao aplicar-se alta voltagem através do comprimento total do canal de separação capilar e do microcanal 36, consegue-se a separação da amostra de ADN em fragmentos de ADN. É aplicada até 1000 V/cm (habitualmente 300 V/cm) de alta voltagem, o que provoca separações rápidas de menos de 10 minutos ao longo de todo o comprimento do canal de separação. O comprimento total da separação é de cerca de 12,5 cm até à zona de detecção. O comprimento capilar da separação inserida dentro do microcanal é de cerca de 6,5 cm. É aplicada alta voltagem a um comprimento ativo total de 16 - 17 cm, o que

poderia ser o comprimento desde a parte de baixo até ao topo de um único capilar com 75 micron I.D. dentro do reservatório de gel como separação única e detecção capilar. Durante a eletroforese, a razão a que os fragmentos de ADN se movem através do gel peneirado é inversamente proporcional à sua massa; isto é, fragmentos de ADN mais leves (ou mais pequenos) movem-se mais depressa do que os pesados (ou maiores). À medida que os fragmentos se aproximam do final da coluna de separação 22 e entram na zona de detecção 30, a energia da luz por excitação de cada um dos doze LEDs (não ilustrado) é distribuída através de fibras óticas de transmissão de luz individual desde a parte de fora da janela de detecção, iluminando os fragmentos de ADN migrantes do tabuleiro de amostra 72. À medida que os fragmentos de ADN se movem através do gel peneirado ou da solução de polímero linear (por exemplo, 25 mM Mops - Tris pH 7,55, tal como vem referenciado em "Pace Setter", Vol. 3, 1ª edição, Abril 1999), um corante intercalador de ADN (brometo de etídio) dentro do gel peneirado permite que os fragmentos de ADN sejam detetados. As experiências mostraram que se conseguem alcançar sensibilidades de detetação de 100 ng/ ml (0,02 ng do Hae III digere ϕ X174 da mistura de teste de ADN), o que constitui diversas ordens de magnitude melhores do que os dispositivos de eletroforese de gel de placa que usam o mesmo corante intercalador. Como os doze LEDs são multiplexos por divisão no tempo (com uma frequência de amostra de 10 - 100 Hz), doze sinais de emissão ligados a doze fibras de detecção de emissão alcançarão um único PMT num tempo escalonado, através de um único conjunto de um molho de fibras.

Para se preparar a operação seguinte com uma outra amostra, purga-se o antigo gel da operação anterior dos capilares através da pressurização do reservatório, para voltar a encher os capilares com gel fresco. Os tabuleiros 70 e 72 transportam soluções transparentes, compilação de lixo e amostras. O gel purgado é levado por um dos tabuleiros 70 e 72 através do posicionamento das extremidades dos capilares numa fila de poços de compilação de lixo num dos tabuleiros. As extremidades dos capilares podem ser limpas com água ou com uma solução de limpeza posicionando-se e mergulhando-se os capilares nessa solução nos poços apropriados do tabuleiro. Quando os capilares estão cheios de novo e prontos para a operação seguinte, as extremidades dos capilares são mergulhadas nas amostras através do reposicionamento dos tabuleiros 70 e 72. A sequência do processo mencionada anteriormente.

Note-se que, como os analitos da amostra que fluíram para o reservatório de gel nas saídas dos capilares são em quantidade e volume de concentração tão pequenos, comparado com o volume do reservatório e que espera-se que os analitos se misturem no reservatório de gel, haverá apenas uns vestígios desprezíveis de analitos de operações anteriores no reservatório e que estarão distribuídos de forma equilibrada no gel que volta a encher os capilares para a operação seguinte. Qualquer som destes vestígios desprezíveis seria som de fundo relativamente pequeno que pode ser facilmente removido do sinal detetado na análise dos dados.

As FIGs. 4 - 9 mostram os passos para a montagem dos componentes no cartucho. Estes são aqui descritos com fins ilustrativos e não devem ser interpretados num sentido limitativo. A FIG. 4 mostra o corpo da secção inferior 110

do cartucho 100. Na extremidade superior do corpo da secção inferior 110 estão aberturas 126 através das quais são colocadas porções das fibras por excitação 116 que estão coladas no lugar. (Pode usar-se um outro meio de fixar estes componentes.) Na extremidade inferior do corpo da secção inferior 110 estão eletrodos 114 que também estão colados (ou inseridos em molde como parte de 110). Os capilares 140 (FIG. 7) são inseridos em buracos 139 e guiados até estes eletrodos (isto é, vinte e quatro fibras por excitação, no caso de atualização para deteção do tipo de ondas duplas). Estas fibras por excitação 116 estão posicionadas para alternar à volta dos doze capilares 140. Isto pode ser visto com maior clareza pois as aberturas de fibras 126a e 126 b, respetivamente, podem ser usadas para as fibras por excitação 116a e 116b (FIG. 4) para o capilar 140, respetivamente.

A FIG. 5 mostra o acrescento do corpo da secção do meio do cartucho 120 para o corpo da secção inferior 110 na FIG. 4. O corpo da secção do meio do cartucho 120 está concebido para que a parte 132 não obstrua o caminho das fibras por excitação 116 ou dos capilares 140. A parte 132 tem um formato em ziguezague que não inclui as fibras por excitação 116 e que é geralmente horizontal enquanto o cartucho está em funcionamento. Esta parte 132 também tem buracos 138, através dos quais, os capilares 140 são colocados, como se poderá ver nas Figuras mais à frente. A extremidade superior 131 do corpo da secção do meio 120, que formará parte do reservatório, também tem buracos 139, através dos quais os capilares 140 serão colocados.

Depois de o corpo da secção do meio 120 do cartucho estar montado no corpo da secção inferior 110, como se pode ver na FIG. 6, colocam-se capilares revestidos com poliamido 140 através dos buracos dos capilares 139 e 138 até alcançarem a extremidade inferior do corpo da secção inferior 110 (ver a FIG. 7). Os capilares 140 têm uma janela prequeimada com o revestimento de poliamido removido para criar uma janela de deteção. Os agramos 136 podem ser usados para fixar os capilares 140 ao corpo da secção do meio 120 do cartucho. Na extremidade superior 131 do corpo da secção do meio 120 fica um elétrodo comum (ânodo) 134 para os capilares que se estendem para dentro do reservatório.

A FIG. 8 mostra o cartucho com os corpos da secção do meio e da secção inferior 110 e 120, respetivamente. Os capilares estendem-se desde o cimo do corpo da secção do meio 120 (com as extremidades capilares 141 a saírem da abertura 131 para o reservatório) para o fundo do corpo da secção inferior 110 com os eletrodos (cátodos) 114. A zona de deteção 155 dos capilares está também ilustrada. As fibras por excitação 116 podem ver-se através das aberturas das fibras 126 (ver também a FIG. 4) até ao conjunto de blocos com ranhuras em forma de V 150, onde a luz das fibras por excitação são direcionadas para os capilares.

Na FIG. 9, mostra-se uma vista de trás do cartucho. O cartucho está integrado com um reservatório de tampão de cima/ saída 130, comum a todos os capilares. O reservatório de gel 130 está preso ao corpo da secção do meio 120 com um anel em forma de O 144 como selo. O reservatório de gel 130 tem uma capacidade de cerca 18 cc e pode ter janelas

transparentes ou invisíveis de cada lado para se inspecionar o nível de gel. O reservatório de gel 130 está ligado a uma bomba de pressão de ar modular 78 (ver também a FIG. 2). A bomba de pressão 78 fornece a pressão de ar necessária para encher os 12 capilares com o gel peneirado. Dependentemente da viscosidade do gel, foram aplicadas pressões até 275,79 kPa (40 PSI) aos capilares através do reservatório cheio de gel. O cartucho 100 tem um único eletrodo (ânodo) 134 na abertura de cima do corpo da secção do meio 120 e vários eletrodos (cátodos) 114 no corpo da secção inferior 110 como parte do conjunto do cartucho. O reservatório de gel do cartucho 140 está equipado com um eletrodo integrado (ânodo) 134 comum para os doze capilares, que fica automaticamente ligado à fonte de energia de alta voltagem 76 através de pinos pogo para a eletroforese, prontos a serem usados, quando instalado dentro do instrumento 200 (analisador de ADN). Uma fonte de energia de alta voltagem disponível no mercado (isto é, Emco) é usada para fornecer 0 a 20 KV de campo eléctrico aos capilares cheios de gel 140 para a injeção eletrocinética e as separações dos fragmentos de ADN.

O reservatório 130, que contém o gel, é selado forma hermética no corpo do cartucho, o que permite ao cartucho ser manuseado, podendo segurar-se nele em qualquer orientação sem que se verta gel. (Há uma fuga ou exposição desprezível nas extremidades capilares devido a tensão na superfície e à grande viscosidade dentro do microdiâmetro dos capilares.) O cartucho 100 tem um septo de borracha (não ilustrado) que é furado por uma agulha não montada no instrumento (ou qualquer outro objeto afiado) que fornece pressão de ar da bomba 78 para o cartucho. Isto permite encher os capilares com uma solução de gel/ tampão após

cada operação de separação, assim como purgar o antigo gel da operação anterior no processo. Esta abordagem assegura um confinamento apropriado do gel dentro do reservatório do cartucho; fornece ainda um meio simples e de confiança para aceder ao reservatório de gel e fornecer pressão de ar suficiente para encher os capilares antes de se aplicar alta voltagem para realizar a separação CE.

O cartucho 100 também possui portas óticas de deteção 161 através das quais as sondas detetoras 170 (FIG. 11) são encaixadas. Através de cada uma destas portas óticas de deteção 161, são colocadas as microlentes 166 para as óticas de recolha de emissão, seguidas por retentores de lentes elastómeros 168. O cartucho possui igualmente uma tampa de cofragem ou uma tira de abertura com multicanais 142, na porta ótica de deteção 161. A tira de abertura 142 pode ser de um material poliéster fino com cerca de 0,5 mm de espessura, o que vai evitar que quaisquer partículas ou objetos estranhos entrem dentro da área da ótica de recolha. As aberturas 142 irão abrir quando a matriz de deteção 170, que contém a ótica de recolha, entra no cartucho. As aberturas 142 irão fechar novamente quando a matriz de deteção 170 é retirada do conjunto do cartucho. O obturador pode também ser uma janela ou tampa mecânica que abre quando tem um interface com a ótica de deteção do instrumento.

A última fase da montagem do cartucho está ilustrada na FIG. 10 com a tampa da parte da frente 146 e a tampa da parte de trás 148. A tampa da parte de trás 148 tem buracos 162 para porta ótica de deteção 161. Existem ainda buracos de ventilação 165 sobre os buracos 162 através dos quais o

ar arrefecido flui dentro do cartucho para arrefecer os capilares.

As FIGs. 11 e 12 mostram a vista de trás 124 do cartucho 100 com uma vista mais clara da matriz de fibras de recolha de emissão 170. A FIG. 12 mostra que o corpo da secção inferior 110 é simétrico à frente e atrás (isto é, ver os LEDs refletidos 184a e 184b). A FIG. 13 mostra uma vista seccional em perspetiva do cartucho 100 com uma sonda detetora 171 da matriz de deteção ótica de recolha de emissão 170 ligada a um único tubo fotomultiplicador (PMT) 178 através de um conector de fibras 174 e um filtro emissor 176.

A FIG. 14 mostra uma vista seccional do cartucho 100 juntamente com os sistemas por excitação e de ótica de emissão. O cartucho 100 é apoiado pela estrutura de apoio 164. O cartucho quando instalado dentro do instrumento através da estrutura de apoio 164 fica alinhado de forma mecânica com os conjuntos de módulo/ cilindro de LEDs. A estrutura do corpo inferior do cartucho 110 fornece o meio de alinhamento ótico ou de ligação do conjunto do cilindro da lente 188 às fibras por excitação dentro do cartucho. O sistema por excitação inclui a ligação das lentes de micro bolas 182 com os respetivos LEDs 184. A luz por excitação dos LEDs 184 é direcionada através das fibras por excitação 116 para a zona de deteção 155 dos capilares. O sistema de emissão inclui a matriz de fibras de recolha de emissão 170 que está ligada à parte de trás 122 do cartucho 100.

O cartucho tem características de alinhamento para ser alinhado facilmente com o módulo de deteção micro ótico dentro do instrumento 200. A matriz de deteção ótica 170 e a matriz de LEDs 184 são todas carregadas com molas, o que fornece forças cúmplices independentes a cada conjunto de cilindro de lentes 188 (isto é, LED ou virola de fibra) para um alinhamento seguro e que pode ser repetido para o cartucho. O cartucho tem todas as características do tipo cónicas próprias (isto é, assento de lentes cónicas 186) para aceitar a mola e as matrizes carregadas de molas do instrumento, como será descrito em maior pormenor a seguir.

Sistema por excitação

Um olhar mais atento à secção A na FIG. 14 mostra o sistema por excitação na FIG. 15. Esta também mostra uma vista seccional do ângulo da secção A do cartucho na FIG. 13. O sistema por excitação é apoiado pela estrutura de apoio por excitação 164 que fica encaixada no cartucho (FIG. 10) durante a sua utilização (como se pode ver na FIG. 11). Uma vez que a fibra por excitação 116 tem de receber luz e direccionar luz ao longo do caminho em direcção à zona de deteção 155, o sistema por excitação está configurado para permitir que a luz necessária entre na fibra por excitação 116 através de uma lente de bola 182 de um LED 184. O sistema por excitação inclui uma lente de bola 182, LED 184 e uma mola de elastómero 190, que ficam todos colocados no cilindro da lente 188, uma bobina de molas 192, estrutura de suporte de pulsações 164, retentor 194 e LED principal 196. Dentro do cilindro da lente 188, a mola de elastómero influencia o LED 184 contra a lente de bola 182. A bobina de mola 192, que fica em descanso na estrutura de apoio

164, fornece conformidade axial e angular no cilindro da lente 188, permitindo deste modo que a lente de bola 182 fique centrada de forma precisa na base da lente cónica 186. Ambas estas forças de influência fornecem um caminho de contacto mais próximo para que a luz por excitação viaje desde o LED 184 através da lente de bola 182 até à fibra por excitação 116.

Duas fibras por excitação 116 para dois comprimentos de onda (para cada capilar) estão integradas dentro do cartucho 100 com um alinhamento fixo na proximidade da zona de deteção capilar 155. Estas duas fibras por excitação 116 estão ligadas a dois LEDs 184 (por exemplo, de duas cores diferentes: 526 nm e 473 nm) quando o cartucho está instalado dentro do instrumento 200 (isto é, no analisador de ADN). Pode separar-se duas cores e detetar-se dois filtros de emissão de cor no módulo de deteção (módulo PMT 178). O cartucho 100 pode ter capacidades para uma única cor para aplicações de análises de fragmentos de ADN e pode também ser atualizado para ter duas capacidades de deteção de duas cores para outras aplicações. É feita referência à patente americana de Aplicação Provisória nº 1031/207 intitulada "Dispositivo portátil de Eletroforese para Análises de multicores e multiplexadas", pedida a 19 de Outubro de 2001 (súmula do solicitador nº 1031/ 209), que é atribuída a BioCal Technology, Inc., o cessionário da presente invenção, é mais direcionada especificamente para o esquema de deteção de tempo escalonado/ multiplexado que pode ser adotado no sistema CE 200, no qual o cartucho 100 está concebido para ser usado.

Um olhar mais atento à secção B na FIG. 13 mostra o sistema de deteção, ou de emissão na FIG. 16. A luz por excitação de uma fonte de luz (por exemplo um LED 184) viaja na fibra

por excitação 116 para zona de deteção 155 do capilar 140. Uma virola de metal 210 fortalece e protege a fibra por excitação 116 que é inserida num bloco de ranhura em forma de V 150. Duas fibras por excitação 116 podem ser guiadas para um bloco de ranhura em forma de V 150, ambas direcionando a luz desde as duas aberturas com menor ângulo do bloco de ranhura em forma de V. A realização preferida para alinhar cada uma das fibras por excitação com um capilar é um único bloco caracterizado por ranhuras mecanizadas em forma de V, que aninha tanto o capilar como a fibra, num alinhamento preciso um com o outro. O bloco pode ser fabricado utilizando-se ferramenta para uma parte cunhada ou através de molde de injeção. Além disso, uma parte de uma máquina de rosca de parafusos em cruz pode ser usada, na qual os capilares e as fibras seriam descarregados em buracos precisos feitos à máquina, ao invés de ranhuras em forma de V.

Quando a luz por excitação é direcionada para as zonas de deteção 155 (ver também a FIG. 17), o sistema de deteção deteta a luz emitida, ou os sinais de emissão a 90 graus, no que respeita ao plano por excitação. A ótica de colimação para o feixe de emissão é necessária, uma vez que a fibra de emissão 180 fica no lado de fora do líquido ou gel. A abertura numérica da fibra por excitação 116 determina a quantidade de densidade de energia lançada para dentro do gel perto da zona de deteção. A fonte de luz por excitação pode ser um LED 184, que é relativamente barato, ou um laser (pode ser um laser em estado sólido, laser em gás, laser de corante ou outros semelhantes). As emissões fluorescentes dos componentes ou analitos separados, na zona de deteção, são recolhidas através de uma microlente 166 e 167. A lente 166 é usada para a recolha de emissões

e, de preferência tem uma propriedade de ângulo de alta recolha (por exemplo, uma microlente de safira com um índice de refração de $n = 1,76$ da Swiss Jewel Company Model # B2,00, que tem uma distância focal curta com uma abertura numérica alta (NA)). A lente 167 é para ligar a luz de emissão colimada produzida pela lente de safira à fibra de emissão 180 (por exemplo, uma microlente BK - 7, disponível na Swiss Jewel Co.). A luz fluorescente, que tem um comprimento de onda maior (por exemplo, 570 a 630 nm) do que a luz por excitação, é depois encaminhada por uma grande fibra ótica central 180 (370 μm O. D., 0,22 fibras NA; mas pode também estar entre os valores de: 100 - 1000 μm O. D., 0,12 - 0,5 NA) para um detetor (por exemplo, um tubo fotomultiplicador Hamamatsu R5984 (PMT)) após passar pelos filtros de emissão de passe longo de separação da cor (por exemplo, usando 570 - 630 nm). Os sinais de emissão são retransmitidos pelas fibras de emissão 180 para o módulo detetor (detetor PMT 178), onde são filtrados por um filtro de emissão simples ou múltiplo 176 e são lidos (detetados) num esquema multiplexado (escalonamento de tempo). A fibra de deteção 180 pode ser vista em maior pormenor relacionada com o sistema de ótica de deteção, como é descrito e ilustrado na FIG. 13.

Torna-se ainda evidente que a zona de deteção não é necessariamente uma zona bem definida com contornos bem definidos, devido à natureza da substancia, à radiação incidente e às emissões fluorescentes. É normalmente uma zona, na qual a luz da fibra por excitação é direcionada para provocar emissões fluorescentes e a ótica de deteção tem o objetivo de capturar parte dessas emissões fluorescentes. A luz da fibra por excitação pode provocar emissões de fluorescência para fora da zona de deteção e

algumas das emissões de dentro da zona podem não ser detetadas pela ótica de deteção. Quanto mais perto a fibra por excitação estiver da zona de deteção, ou quanto mais alta for a densidade da energia da luz por excitação, tanto mais fortes serão os sinais de emissão aí recolhidos.

No dispositivo CE multicapilar da presente invenção, as fontes de luz por excitação fluorescente podem ser LEDs super brilhantes azuis ou verdes. As características atrativas do LED como fonte de luz, são o seu baixo custo, o tamanho pequeno, longo tempo de vida, boa intensidade e a estabilidade que resulta em pouco ruído térmico e na possibilidade de modulação eletrónica direta da intensidade. Os LEDs contemplados nesta invenção são baseados em tecnologia de material de InGaN (por exemplo, HLMP - CB15 e HLMP - CM15 de Agilent) com uma potência de saída de luz média de 2,5 - 3 mW. As características espectrais com o seu comprimento de onda no máximo e largura por metade (nm) de LEDs InGaN indicam que estes LEDs podem ser usados para a excitação da fluorescência com espectros de excitação no âmbito de 440 a 570 nm (por exemplo, fluoresceína, rodamina, brometo de etídio, tiazol laranja) e para a frequência no âmbito de 1 Hz a 100 MHz. Uma vez que o tempo de resposta destes LEDs é muito alto (de algumas centenas de nanossegundos), podem pulsar em grandes correntes para a frente, até 100 mA no funcionamento de modo de pulsação, para se obter picos radiantes altos. O funcionamento pulsado dos LEDs pode ser habitualmente alcançado através de circuitos de condução de transístores. Podem realizar-se saídas de luz de LED com picos significativamente mais altos a partir de grandes pulsações de corrente condutora em ciclos de dever baixos (isto é, 5%, 10%, 25% ou 50%) do que em funcionamento DC.

Poderão usar-se diferentes cores de LEDs (isto é, LEDs azuis ou verdes) como fontes de excitação para a excitação de diferentes fluoróforos (diferentes aplicações). A realização preferida usa LEDs com comprimento de onda no âmbito de 500 - 600 nm, e especificamente de 524 nm. Um segundo módulo de LED, ou um LED de uma segunda cor, poderá ser acrescentado à concepção da corrente para um dispositivo de detecção com dois comprimentos de onda, trazendo dois comprimentos de onda para o microcanal usando uma ou duas fibras. A plataforma de detecção/ separação da corrente poderá ser expandida com módulos de LED duplos, com óticas de excitação e de recolha com um segundo PMT para fornecer um detetor de fragmentos de ADN de detecção por fluorescência com vários comprimentos de onda.

As fontes de luz de excitação poderão ser mudadas de LEDs para Diodos de Laser (laser em estado sólido semiconductor). Em alternativa, poderão ser lasers de pulsação (por exemplo, lasers em estado sólido, lasers de gás, lasers de corante, lasers de fibra). A principal razão para se usar LEDs (isto é, Verdes, 524 nm) é o seu baixo custo, super brilho e embalagem pequena. Os LEDs do tipo Surface Mount (SMT) poderão ser usados, utilizando-se quer fibra ligada, quer um esquema ligado diretamente de traseira com traseira aos capilares para distribuir a luz de excitação aos analitos de separação. Uma fonte de luz alternativa para este instrumento seria os diodos de laser no âmbito de 400 - 800 nm.

Um perito nesta técnica irá reconhecer que o instrumento que inclui a essência desta invenção pode também ser usado

para outras análises biomoleculares. Por exemplo, através da alteração do gel ou buffer de separação, o sistema pode ser modificado para analisar biomoléculas como proteínas, hidratos de carbono e lípidos. Usando-se vários cartuchos da presente invenção com multicanais e com diferentes químicas de buffer/ gel, capilares, etc, uma determinada química de buffer/ gel, com um capilar correspondente (por exemplo, com determinados revestimentos de parede interna e determinados tamanhos de coluna), pode ser facilmente substituída para se adaptar a aplicações de separação com base numa determinada amostra e condições de funcionamento, para se conseguir diferentes separações, tipos, velocidades, resoluções, etc. O mesmo cartucho pode ser posto à parte e ser reutilizado mais tarde para conduzir futuras operações de separação. Comparado com os sistemas CE da técnica anterior, o tempo de montagem para a preparação do atual sistema CE 200 usando um cartucho 100 para fazer diferentes testes, pode ser reduzido de forma significativa, uma vez que a coluna de separação, o meio de separação e pelo menos a ótica de deteção necessitam de um alinhamento fino, no que respeita aos capilares, estão todos incluídos nos cartuchos. A reutilização do cartucho reduz de forma significativa, o custo do material para o sistema CE. Além disso, como a matriz do gel com o corante intercalado está hermeticamente selada dentro do cartucho, fornece uma boa solução para um produto seguro para o ambiente/ "Verde". O fluoróforo e/ ou a matriz de gel pode conter matérias cancerígenas e outros prejudiciais à saúde e ao ambiente. Ao embalar-se o gel dentro do cartucho, isso vai facilitar de forma significativa o seu manuseamento e melhorar a segurança. O cartucho pode ser recolhido e descartado de forma segura para o ambiente, ou pode ser reciclado, com as partes gastas substituídas ou remodeladas por técnicos treinados, para evitar prejudicar o ambiente.

Com esta abordagem com multicanais de auto alinhamento (partes micro óticas imóveis) e com ótica integrada automática e modular, o funcionamento do instrumento torna-se mais simples, mais seguro, fornecendo no entanto um alto rendimento. O cartucho 100 com uma ótica préalinhada, auto incluída, no que respeita aos canais de separação, pode ser facilmente incluído no sistema CE 200. Além disso, este esquema de deteção com multicanais poderá ser expandido ou escalado para mais do que doze, ou até para inúmeros canais de deteção (por exemplo, 96 canais) sem enfraquecer a sensibilidade de deteção. A outra vantagem deste método de deteção simples do tipo de tempo multiplexado é o facto de haver cruzamentos desprezíveis ou inexistentes entre os canais, quando comparado com qualquer outro dos esquemas de deteção LIF com alto rendimento.

Enquanto que nas realizações descritas anteriormente, as fontes de radiação múltiplas têm o mesmo comprimento de onda, prevê-se que seja possível configurar as fontes de radiação múltiplas para diferentes comprimentos de onda, para complementar as amostras específicas, as aplicações de deteção à base de amostras ou químicas de gel em diferentes capilares.

A radiação incidente para a deteção pode ser direccionada para a zona de deteção e/ ou as emissões de radiação, a partir da zona de deteção, podem ser saídas axiais juntamente com o meio de separação. Pode adotar-se uma zona de deteção mais larga. São feitas referências à Patente americana nº 2002 197 735 intitulada Deteção Ótica em Dispositivos de Bio Separação Usando-se uma Entradas de

Radiação Axial, à Patente americana nº 2002 197 736, intitulada Detecção Ótica em Dispositivos de Bio Separação Usando-se Saídas de Radiação Axial e à Patente americana nº 2002 196 442, intitulada Detecção Ótica em Dispositivos de Bio Separação Usando-se uma Zona de Detecção Alargada, todas arquivadas em 22 de Junho de 2001, que são vulgarmente atribuídas a BioCal Technology, Inc., o cessionário da presente invenção.

O instrumento de baixo custo da presente invenção tem uma conceção de cartucho com multicanais descartável/reciclável (uma vez que a maioria das partes poderão ser recuperadas e depois reembaladas ou reutilizadas. A única parte que seria substituída são os capilares e o gel), um sistema de deteção fluorescente, e um mecanismo de tabuleiro de manuseamento incluindo (prato com 96 poços). As experiências demonstraram que as análises às amostras ficam completas em apenas 4 a 10 minutos por cada doze canais (doze resultados paralelos para doze amostras de teste). O sistema de análise de ADN é uma estação de trabalho com alto rendimento completa que manuseia análises completas a fragmentos de ADN desde injeção a deteção, a recolha de dados de fragmentos. A sensibilidade de deteção para um único capilar, usando o modo de deteção da presente invenção anteriormente descrito, é da ordem de 0,02 ng do fragmento de ADN em menos de 10 minutos de separações (usando HaeIII de digestão ϕ X174 de bacteriófago de mistura de teste de ADN). Este tipo de abordagem para se conseguir doze microcanais/ capilares a funcionarem em paralelo produz resultados em 10 minutos para todas as doze amostras com eletroforese. Este tipo de velocidade de separação e de sensibilidade de deteção é várias ordens de magnitude melhor do que as técnicas de placa de gel - eletroforese.

Enquanto esta invenção tem sido ilustrada e descrita em particular com referência às realizações preferidas, deverá ser entendido pelos peritos nesta técnica, que podem ser feitas várias alterações na forma e pormenor. Por exemplo, a fontes de radiação de excitação poderá ser, LEDs, Diodos de Laser (lasers em estado sólido semi-condutores), laser de impulsos (por exemplo, lasers em estado sólido, laser de gases, lasers de coloração, lasers de fibra), ou outras fontes de radiação. Os LEDs (por exemplo, Verde, 524 nm) estão associados ao baixo custo, super brilho e embalagem pequena. Uma fonte de luz relativamente barata alternativa para a presente invenção poderiam ser diodos de laser no âmbito de visível, UV e/ ou infravermelhos. Por exemplo, os diodos de laser no âmbito de 400 - 900 nm e, mais especificamente no âmbito de 400 - 600 nm, podem ser usados, por exemplo.

Um perito nesta técnica irá reconhecer que o instrumento que inclui a essência desta invenção pode também ser usado para a análise bio molecular, para além da análise de ADN. Por exemplo, ao alterar o gel ou buffer de separação, o sistema pode também ser modificado para analisar bio moléculas como proteínas, hidratos de carbono e lípidos.

Como exemplo, e não como limitação, o esquema de deteção da presente invenção é descrito em ligação à eletroforese capilar e à detetação fluorescente de radiação induzida. Deve entender-se que a presente invenção é também aplicável à deteção de analitos separados baseados em fenómenos de bio separação, para além de eletroforese, e a deteção de emissões de radiação, para além das emissões fluorescentes,

incluindo outros tipos de radiação emissora, tais como fosforescência, luminescência e quimioluminescência, assim como deteção à base de absorção.

Além disso, enquanto que os canais de separação nas realizações descritas são definidos por colunas ou tubos cilíndricos, deverá entender-se que os conceitos da presente invenção são igualmente aplicáveis a canais de separação definidos por canais abertos, por exemplo microcanais definidos por cauterização num substrato (dispositivos do tipo de micro fluidos ou bio chips).

O mecanismo de transporte pode ser configurado para mover os tabuleiros num plano horizontal e um mecanismo de transporte adicional pode ser fornecido para mover o cartucho verticalmente para aceder aos tabuleiros.

Deste modo, a invenção apresentada deve ser considerada meramente em termos ilustrativos e limitada no seu âmbito apenas como especificado nas reivindicações em anexo

Lisboa, 29 de Novembro de 2011

REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de referências citadas pelo requerente é apenas para a conveniência do leitor. A mesma não faz parte do documento de Patente Europeia. Embora muito cuidado tenha sido tomado na compilação das referências, erros e omissões não podem ser excluídos e o EPO nega qualquer responsabilidade neste sentido.

Documentos de Patente citados na descrição

US 2002113213 A

US 5198091 A, Burolla

US 5413686 A, Klein

US 5338427 A, Shartle

US 5916428 A

US 2002197735 A

Us 2002197736 A

US 2002196442 A

Literatura que não é patente citada na descrição

Pace Setter, April 1999, vol. 3 (1)

Reivindicações

1. Um cartucho de multicanais (100) para a bio separação, compreendendo:

um corpo (120);

uma pluralidade de canais de separação capilar (36) para analitos no corpo, definindo cada canal de separação capilar (36) uma janela de deteção;

uma câmara no corpo (120); e

meio ótico;

caracterizado pelo facto de:

a câmara definir um reservatório (130) e conter um gel de apoio à separação que fica selado contra fugas quando o cartucho (100) é manuseado segurando-se o cartucho em qualquer orientação;

o reservatório (130) estar em comunicação de fluidos comum aos canais de separação capilar (36); e

o meio ótico estar incluído e integralmente suportado dentro do corpo para direccionar a luz de excitação para a referida janela de deteção ou emissão de radiação da referida janela, compreendendo o referido meio ótico, portas de deteção óticas (161) e fibras óticas de excitação (116) com uma extremidade alinhada pelo corpo (120) aos canais de separação capilar (136) e com a outra extremidade posicionada pelo corpo (120) para a ligação a fontes de radiação externas (184).

2. O cartucho de multicanais, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por pelo menos um dos seguintes: portátil, reciclável, reutilizável e substituível por outros cartuchos com um meio de apoio de separação diferente e canais de separação capilares (36).

3. O cartucho de multicanais, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, compreendendo ainda um eletrodo (134) ligado de forma elétrica ao reservatório (130).

4. O cartucho de multicanais, de acordo com a reivindicação 3, compreendendo ainda um outro eletrodo (114) ligado de forma elétrica a cada extremidade dos canais de separação capilar (36) que estão afastados do reservatório (130).

5. O cartucho de multicanais, de acordo com a reivindicação 1, em que os canais de separação capilar (36) compreendem colunas (22) suportadas pelo corpo.

6. O cartucho de multicanais, de acordo com a reivindicação 1, em que o gel é um tipo próprio para a eletroforese capilar.

7. O cartucho de multicanais, de acordo com a reivindicação 1, compreendendo ainda um interface para a introdução de ar pressurizado no reservatório (130) para purgar e encher os canais de separação capilar (36) com o meio de apoio à separação.

8. O cartucho de multicanais, de acordo com a reivindicação 7, em que o interface inclui um septo que pode ser perfurado para se introduzir ar pressurizado no reservatório (130).

9. Um sistema de bio separação (200), compreendendo:

uma base (74);

um cartucho de multicanais (100) para a bio separação, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 8, apoiado na base (74);

meio de posicionamento (80) apoiado na base para o posicionamento de amostras no que respeita aos canais de separação capilar (36);

meio de separação para realizar a bio separação das amostras juntamente com os canais de separação capilar; e

meio de controlo (32) para controlar as operações do sistema de bio separação.

10. O sistema de bio separação, de acordo com a reivindicação 9, compreendendo ainda: uma fonte de radiação (184) que direciona a radiação para a zona de deteção (155); e um detetor (24) que deteta radiação da zona de deteção (155).

11. O sistema de bio separação, de acordo com a reivindicação 9, em que o meio de separação compreende um mecanismo de eletroforese que realiza a separação de eletroforese das amostras nos canais de separação capilar.

12. O sistema de bio separação, de acordo com a reivindicação 9, compreendendo ainda um meio de pressão (78) que pressuriza o reservatório (130) para purgar e encher os canais de separação capilar (36).

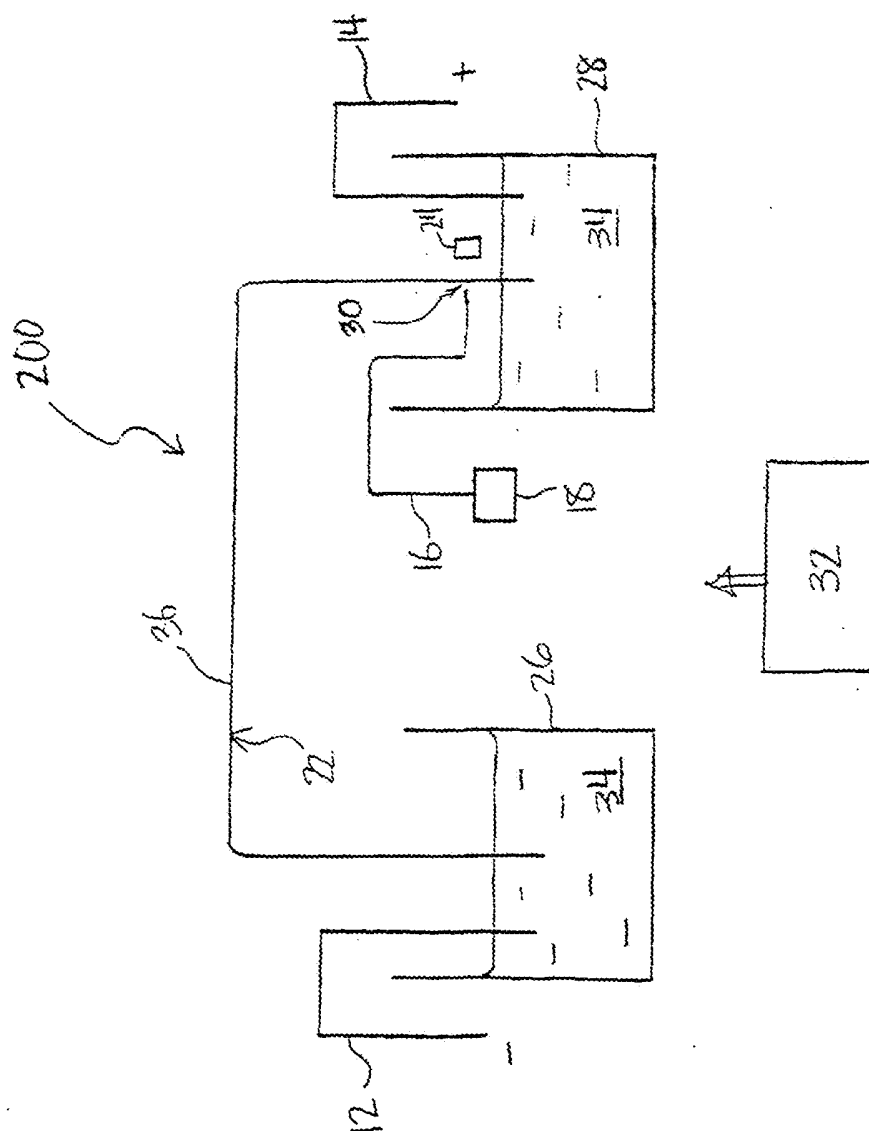
13. O sistema de bio separação, de acordo com a reivindicação 11, em que o meio de separação compreende uma fonte de voltagem (76) que fornece um potencial elétrico para realizar a separação de eletroforese das amostras nos canais de separação capilar (36).

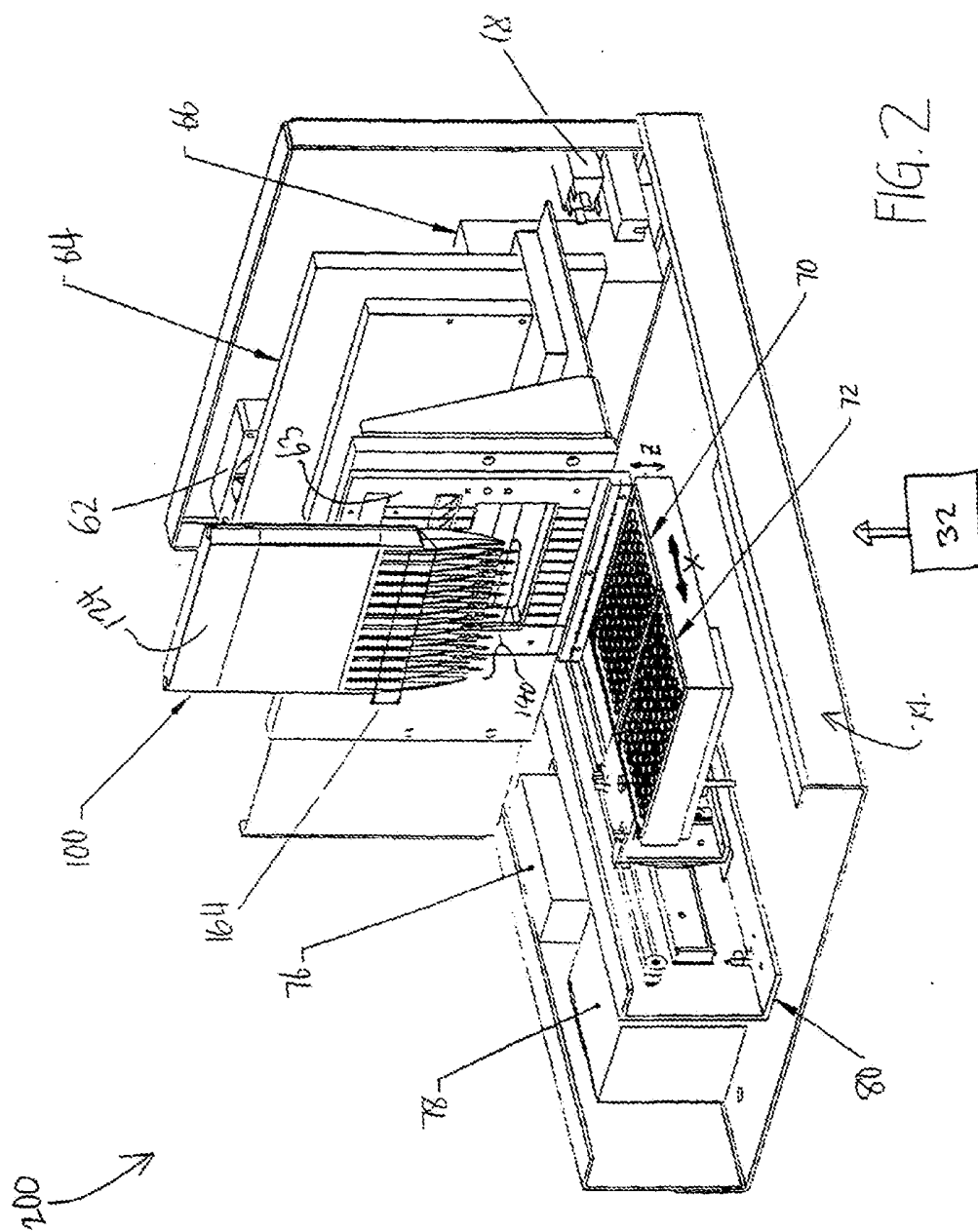
14. O sistema de bio separação, de acordo com a reivindicação 9, em que o meio de posicionamento compreende um mecanismo de posicionamento (80) nas amostras apoiadas num plano horizontal, no que respeita ao cartucho de multicanais (100), de tal modo que os canais de separação (36) ficam em comunicação de fluidos com o recipiente.

15. O sistema de bio separação, de acordo com a reivindicação 9, em que O sistema de bio separação, de acordo com a reivindicação 9, os canais de separação capilar (36) compreende colunas capilares (22) apoiadas pelo corpo (120) e as colunas capilares (22) têm extremidades (140) desde o cartucho de multicanais (140), no que respeita ao recipiente (72) de amostras, de tal modo que as extremidades (140) têm acesso às amostras.

Lisboa, 28 de Novembro de 2011

FIG. 1





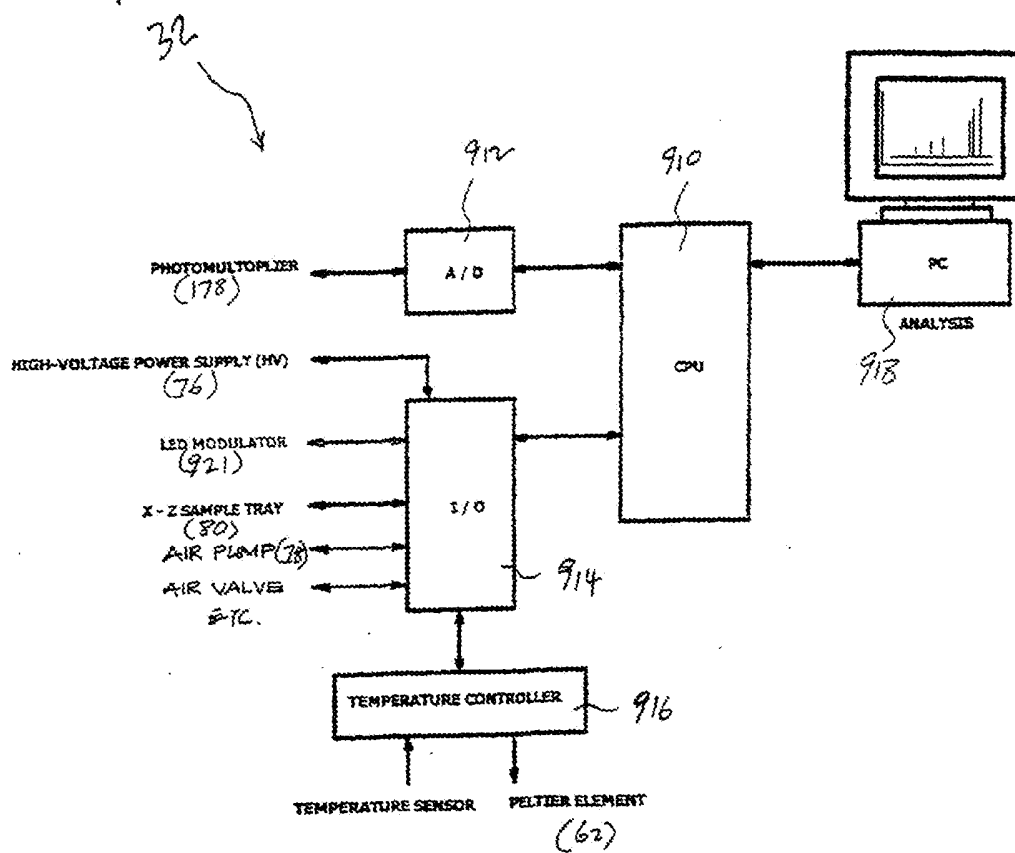
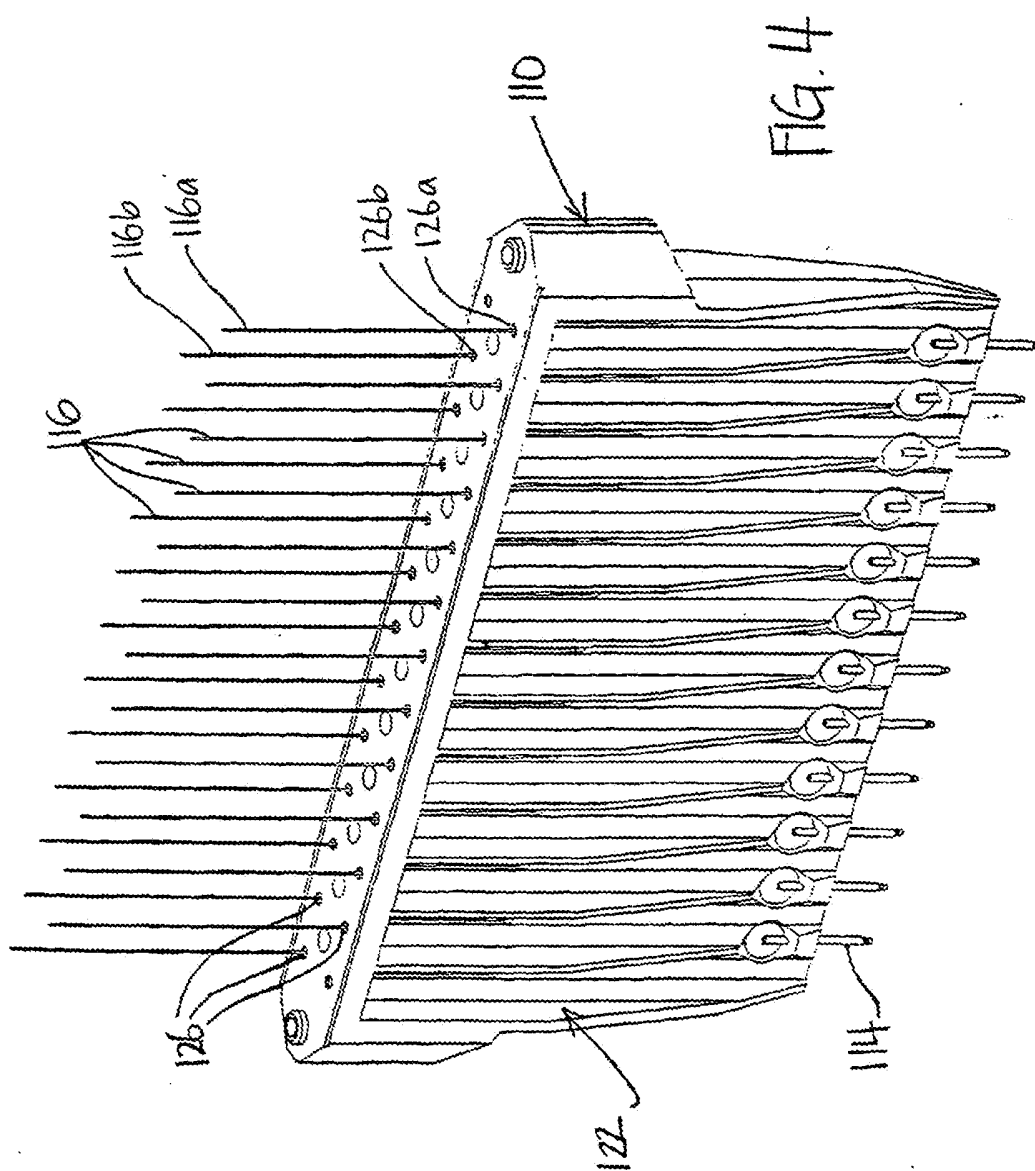
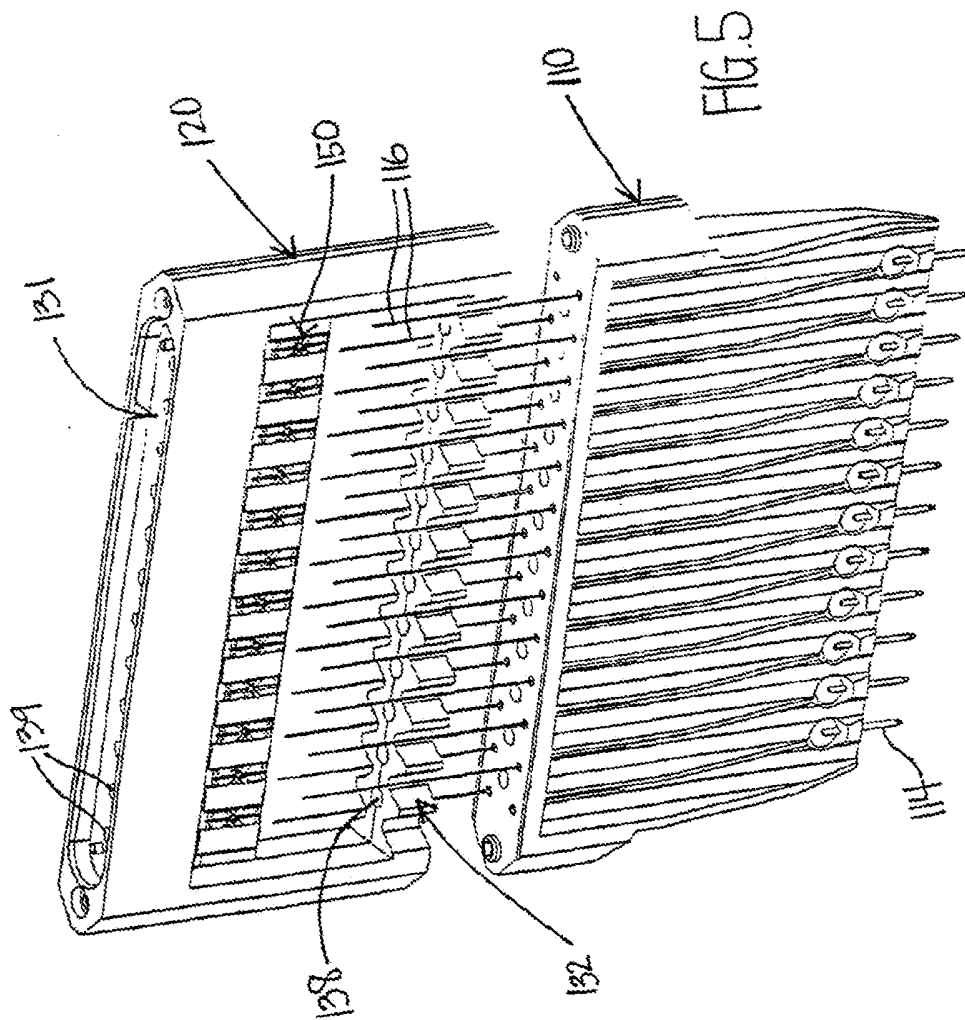


FIG. 3





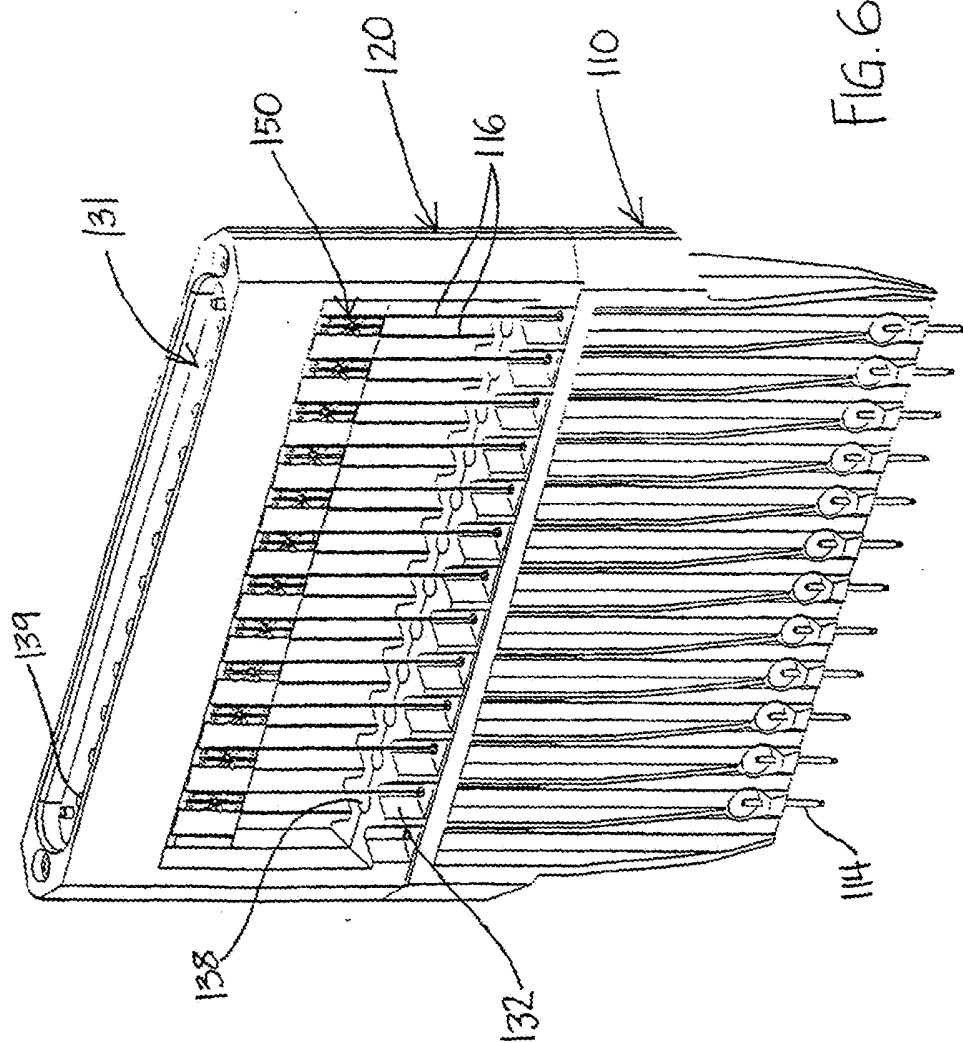
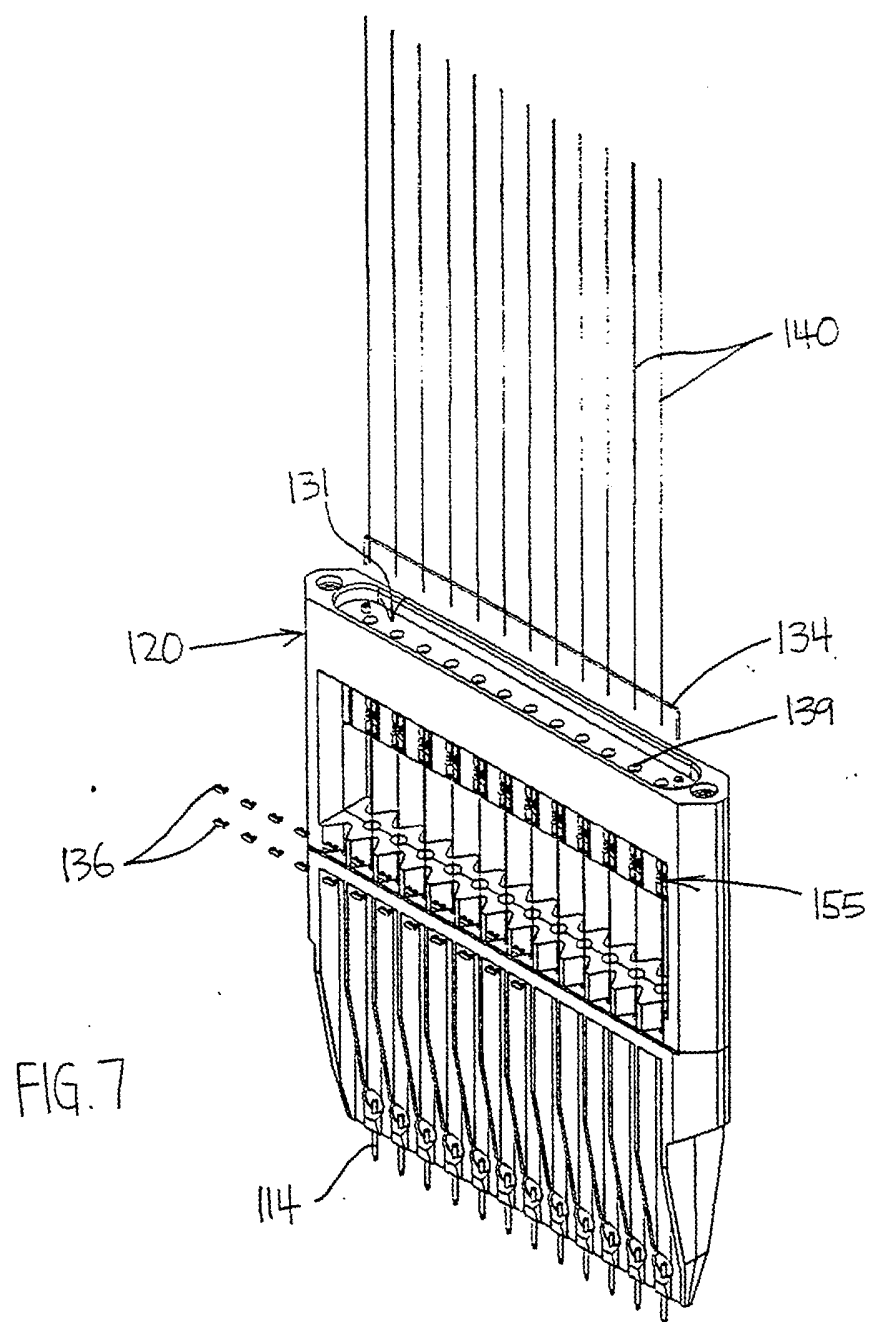


FIG. 6



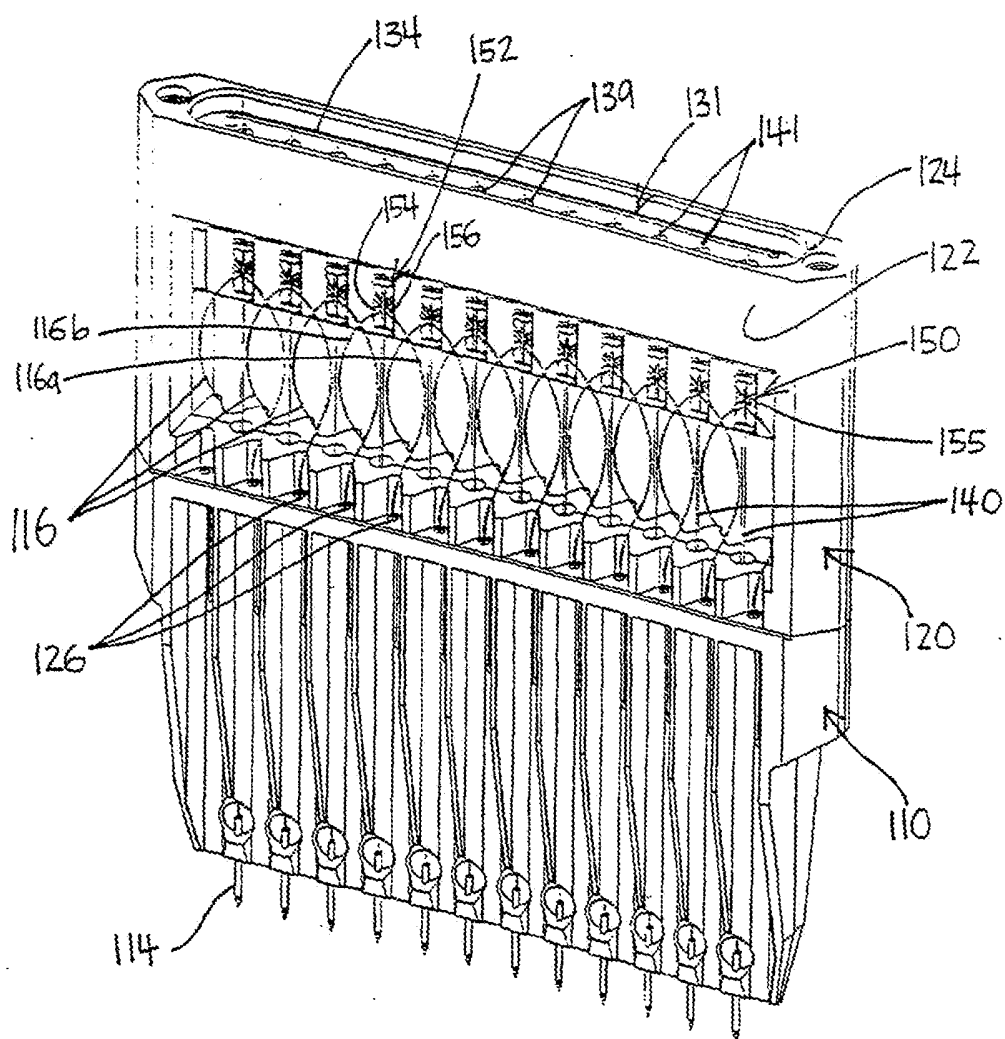


FIG. 8

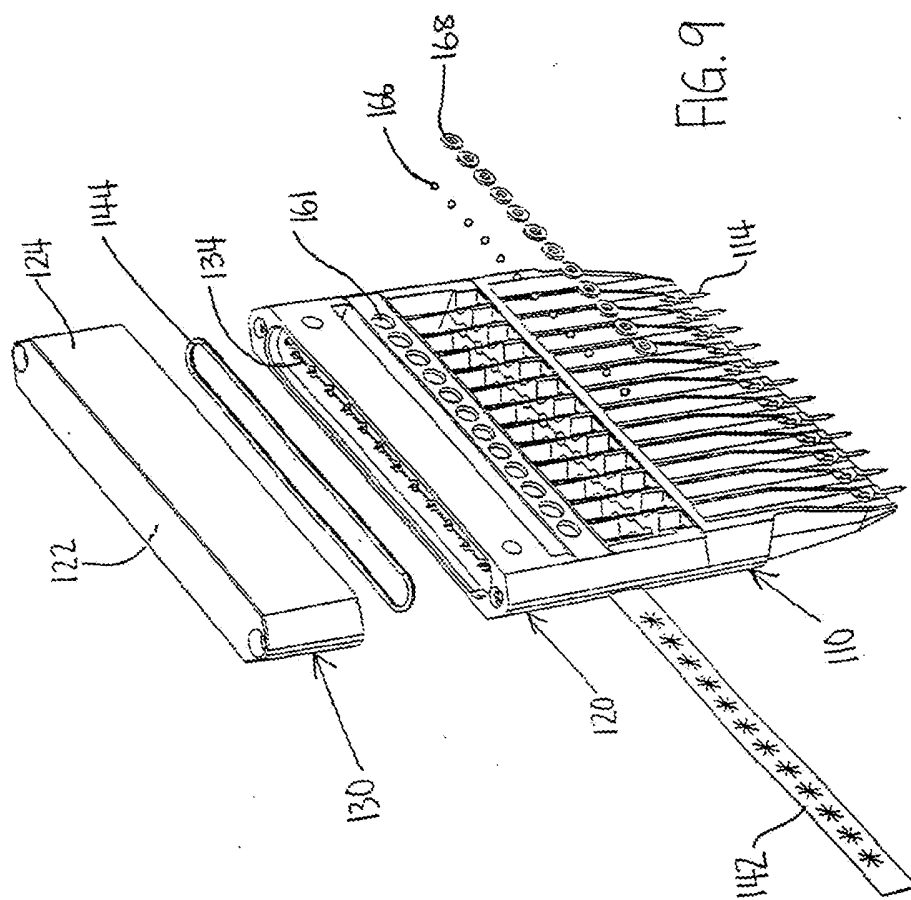


FIG. 9

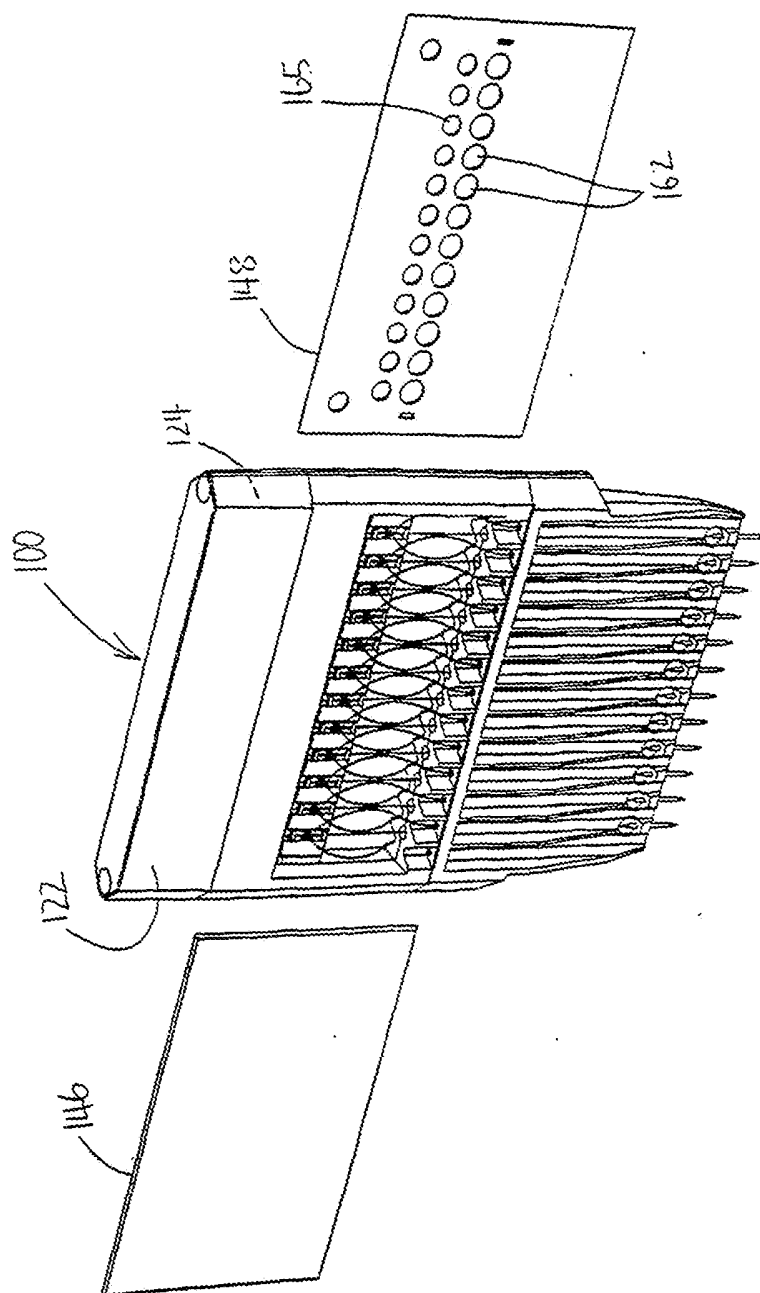


FIG 10

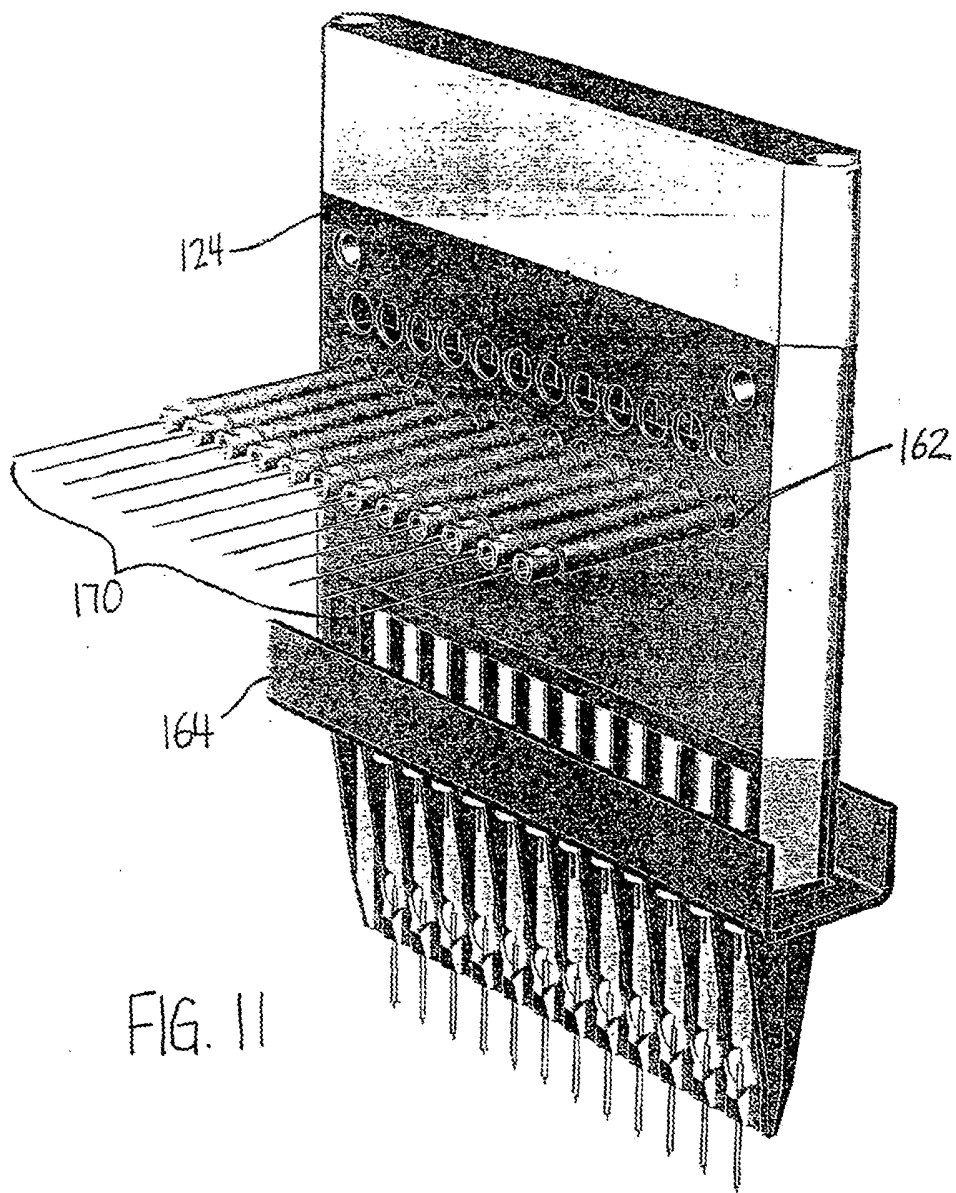
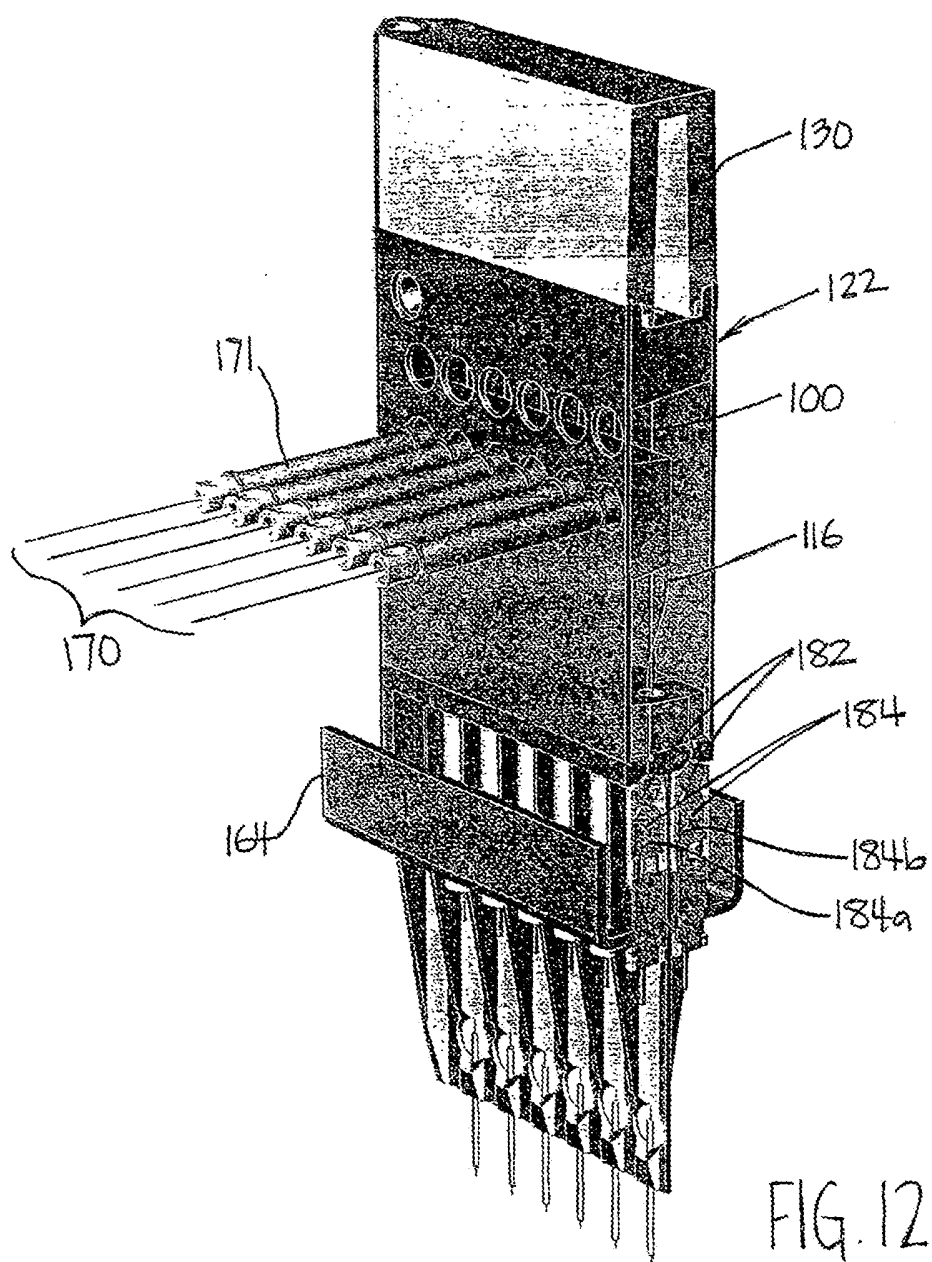


FIG. 11



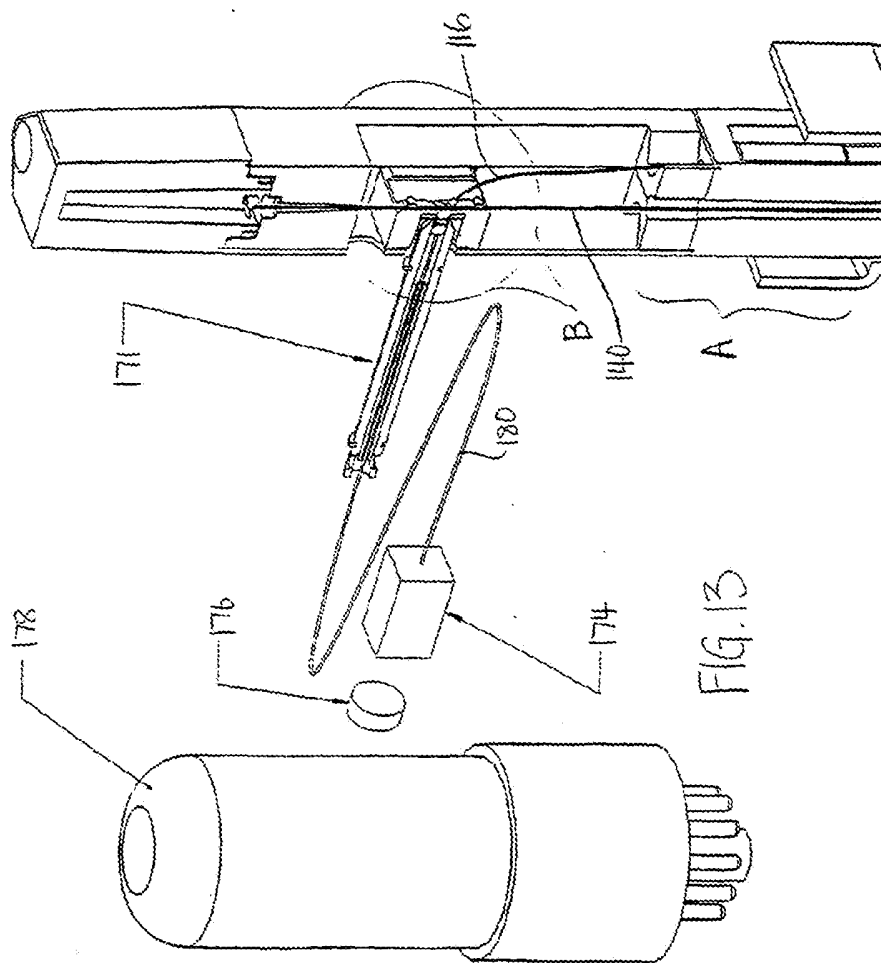
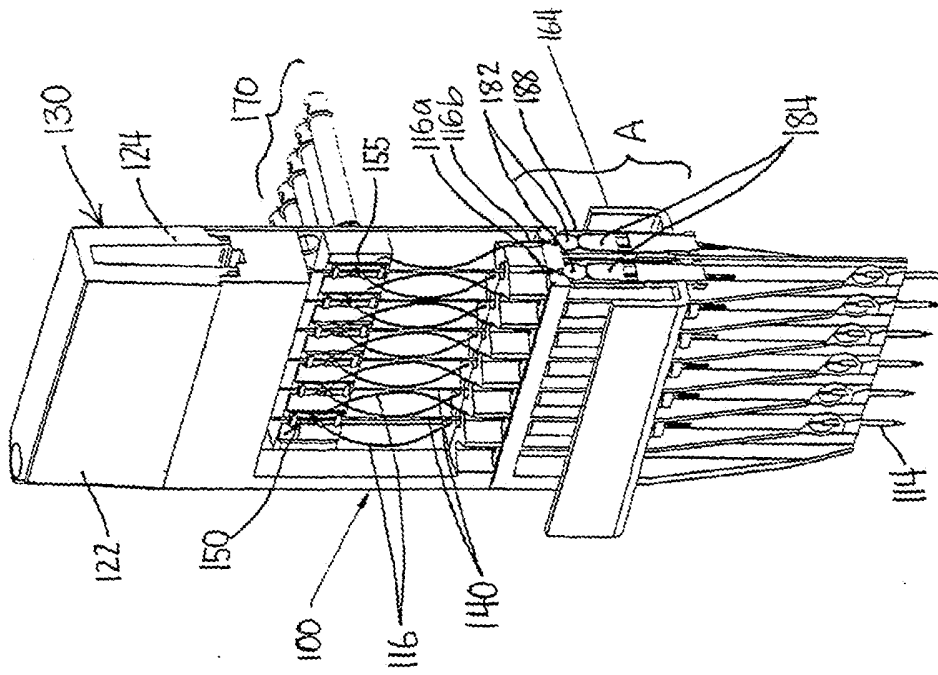


FIG. 14



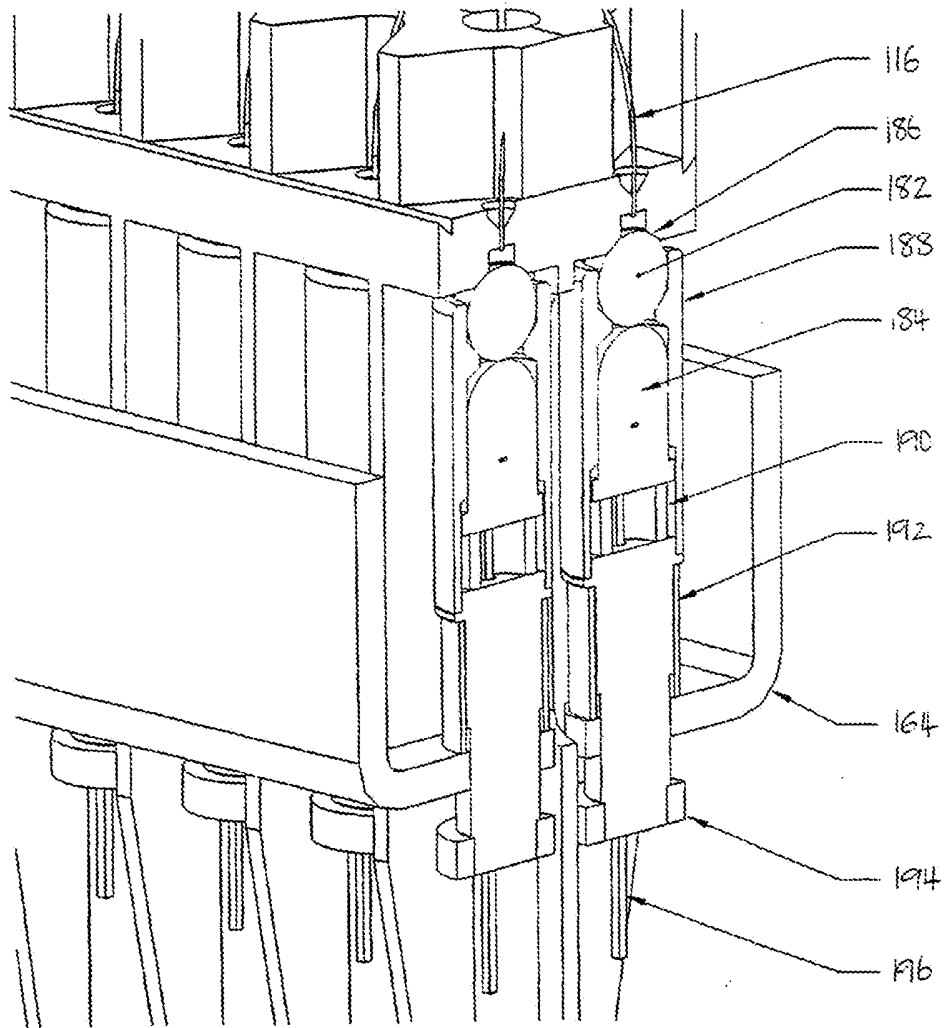
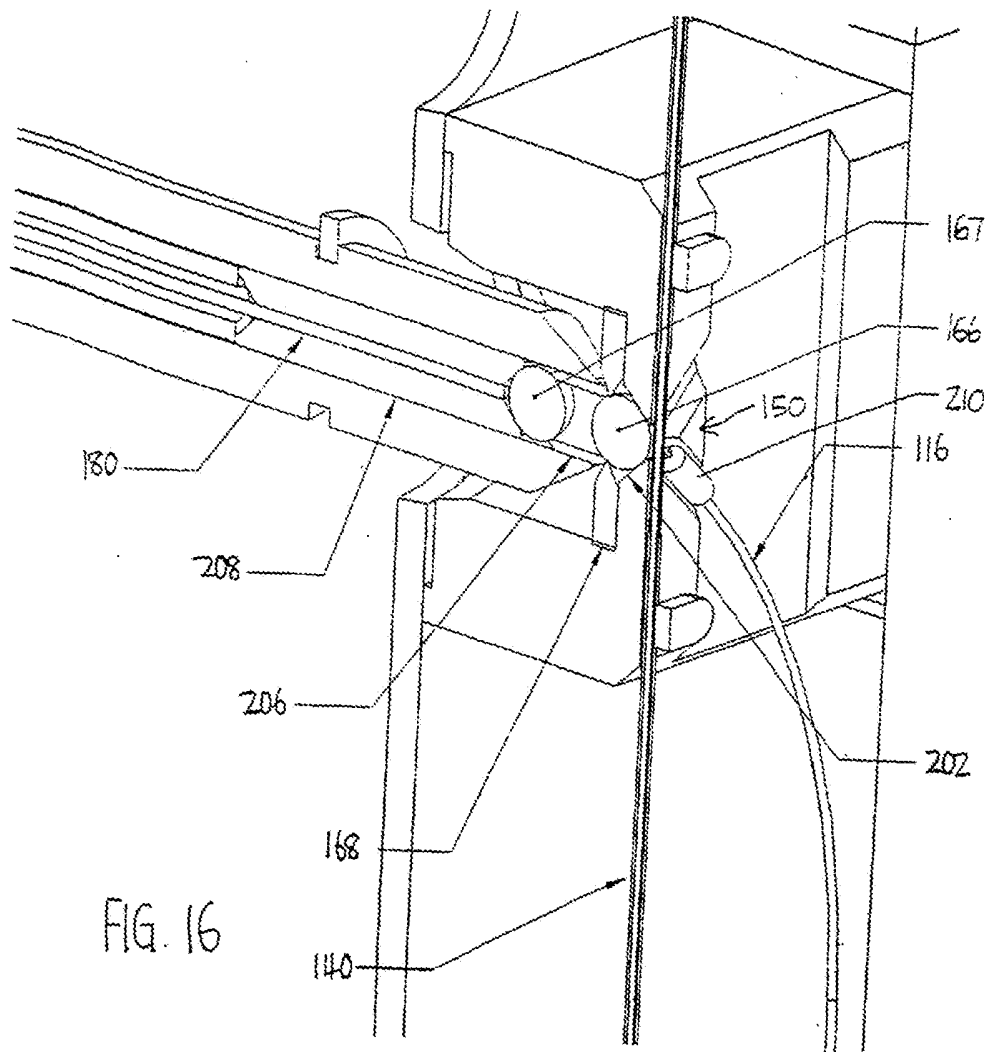


FIG. 15



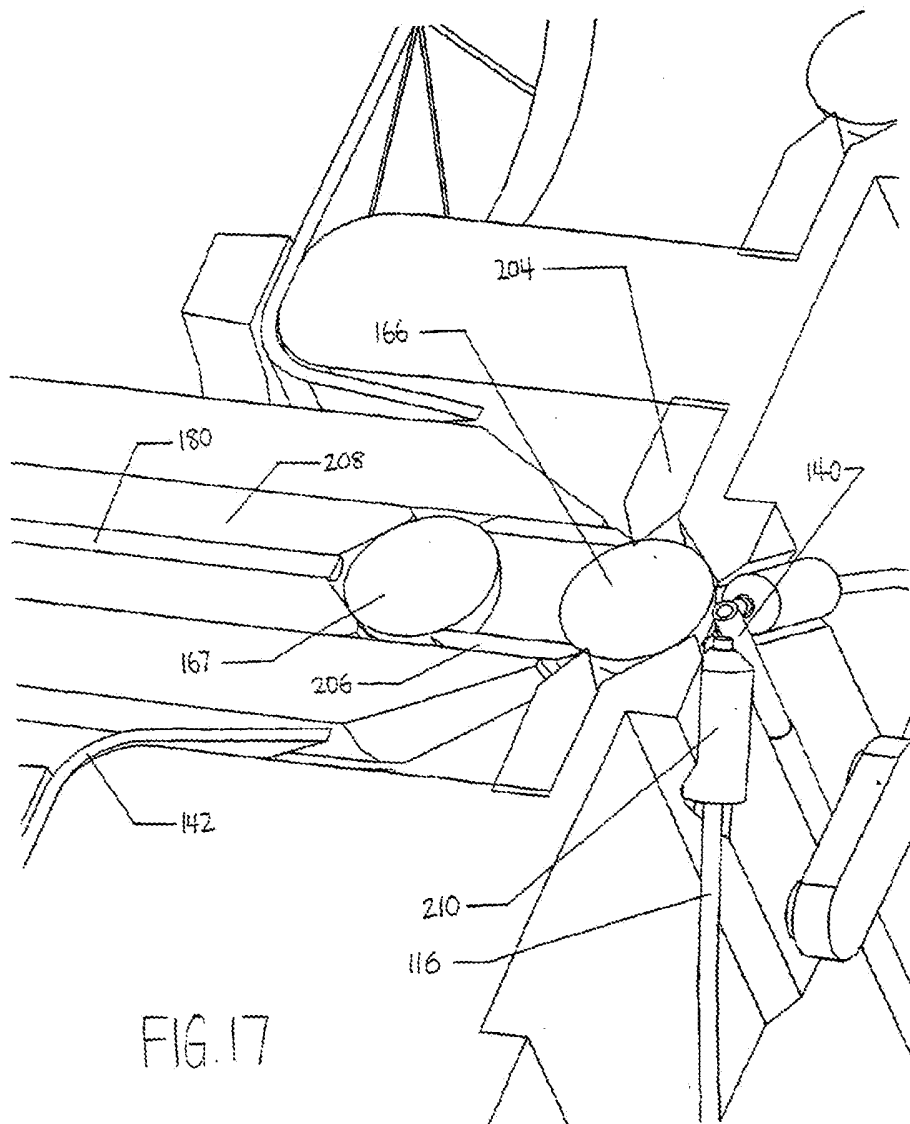


FIG. 17