

PURIFICAZIONE ED AMPLIFICAZIONE DI ACIDI NUCLEICI IN UN DISPOSITIVO MICROFLUIDICO  
COMPREDENTE SUPERFICI DI POLIDIMETILSILOSSANO

*Original*

PURIFICAZIONE ED AMPLIFICAZIONE DI ACIDI NUCLEICI IN UN DISPOSITIVO MICROFLUIDICO  
COMPREDENTE SUPERFICI DI POLIDIMETILSILOSSANO / Cocuzza, Matteo; Giuri, Eros; Lunelli, Lorenzo;  
Pasquardini, Laura; Pederzoli, Cecilia; Pirri, Candido; Potrich, Cristina; Quaglio, Marzia. - (2012).

*Availability:*

This version is available at: 11583/2861074 since: 2021-01-14T12:03:02Z

*Publisher:*

*Published*

DOI:

*Terms of use:*

This article is made available under terms and conditions as specified in the corresponding bibliographic description in the repository

*Publisher copyright*

(Article begins on next page)



**MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO**  
**DIREZIONE GENERALE PER LA LOTTA ALLA CONTRAFFAZIONE**  
**UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI**

<b>DOMANDA DI INVENZIONE NUMERO</b>	<b>102010901885820</b>
<b>Data Deposito</b>	<b>29/10/2010</b>
<b>Data Pubblicazione</b>	<b>29/04/2012</b>

Classifiche IPC

Titolo

**PURIFICAZIONE ED AMPLIFICAZIONE DI ACIDI NUCLEICI IN UN DISPOSITIVO  
MICROFLUIDICO COMPRENDENTE SUPERFICI DI POLIDIMETILSILOSSANO**

DESCRIZIONE dell'invenzione industriale dal titolo:  
"Purificazione ed amplificazione di acidi nucleici  
in un dispositivo microfluidico comprendente super-  
fici di polidimetilsilossano"

Di: POLITECNICO DI TORINO, nazionalità italiana,  
Corso Duca degli Abruzzi, 24, 10129 TORINO  
FONDAZIONE BRUNO KESSLER, nazionalità italiana,  
Via Santa Croce, 77, 38100 TRENTO  
Matteo COCUZZA, nazionalità italiana, Località  
Indritti Fisca, 2 bis, 10070 SAN CARLO CANAVESE  
(Torino)

Inventori designati: Laura PASQUARDINI, Cristina  
POTRICH, Lorenzo LUNELLI, Cecilia PEDERZOLLI, Fa-  
brizio Candido PIRRI, Eros GIURI, Marzia QUAGLIO,  
Matteo COCUZZA

Depositata il: 29 ottobre 2010

\*\*\*

DESCRIZIONE

La presente invenzione si riferisce al settore  
dei dispositivi microfluidici, del tipo denominato  
correntemente con il termine LAB-ON-A-CHIP, atti ad  
effettuare su di un campione un saggio biologico  
comprendente uno stadio di estrazione/purificazione  
di acidi nucleici (DNA) dal campione ed uno stadio  
di amplificazione/rivelazione degli acidi nucleici

mediante reazione a catena della polimerasi (PCR e RT-PCR).

Recentemente, sono stati proposti e descritti dispositivi microfluidici che consentono di effettuare, in un'unica struttura integrata, le tre operazioni di estrazione degli acidi nucleici, amplificazione e rivelazione.

Chen et al. in Biomed. Microdevices (2010) 12:705-719, descrive un dispositivo del tipo sopra citato, in cui si effettuano le operazioni di lisi, isolamento dell'acido nucleico, amplificazione enzimatica e rivelazione in una struttura di policarbonato. In tale microdispositivo, la fase di estrazione del DNA viene effettuata con sali caotropici su membrane di silicio e successiva eluizione, e la reazione di PCR avviene con passivazione dinamica con l'impiego di BSA (albumina bovina); nonostante il dispositivo microfluidico consenta di effettuare il saggio biologico nella sua interezza, le reazioni dei singoli stadi devono essere effettuate spostando il campione in zone fisicamente diverse del dispositivo.

WO2006/085948 descrive un dispositivo microfluidico integrato includente una regione di estrazione/purificazione di acidi nucleici ed una regio-

ne di amplificazione/rivelazione, effettuate mediante RT-PCR. Questo dispositivo presenta, nella regione di estrazione del DNA, colonnine microfabbricate con rivestimento di silice e la purificazione del DNA è effettuata utilizzando un tampone di lisi, contenente sali caotropici, atto ad aprire le cellule ed a legare il DNA alle colonnine microfabbricate. Dopo uno stadio di lavaggio per la rimozione del materiale indesiderato, il DNA viene rilasciato dalle colonnine ed utilizzato per la reazione di RT-PCR in una regione di amplificazione con superfici passivate mediante BSA.

EP 2 160 243 A1 descrive un dispositivo microfluidico atto ad effettuare la lisi cellulare e l'estrazione del DNA; il PDMS (polidimetilsilossano) è indicato tra i vari materiali utilizzabili per la struttura del microdispositivo; tuttavia, il microdispositivo presenta una struttura di tipo modulare con regioni e parti diverse, specificatamente studiate per utilizzare ed eseguire parte dei protocolli contemplati; l'operazione di amplificazione del DNA viene effettuata trasferendo il DNA in un'unità di amplificazione.

Sono altresì noti dispositivi microfluidici di PDMS predisposti per amplificazione genica e/o ri-

velazione; in questi microdispositivi vengono sempre utilizzati agenti passivanti per modificare le superfici di PDMS ed ottenere l'amplificazione del materiale genico.

Frey et al. in Biomed. Microdevices (2007) 9:711-718 descrive un sistema di amplificazione miniaturizzata in PDMS, in cui nel mix di PCR viene inserito un colorante specifico per il DNA a doppia elica; le pareti del dispositivo in PDMS sono ricoperte con poli "L-lisina" coniugata con poli etilenglicole (PLL-g-PEG), per rendere la superficie idrofilica ed aumentare la resa PCR.

La presente invenzione si fonda sulla scoperta del fatto che superfici di polidimetilsilossano, in virtù delle loro caratteristiche chimiche e morfologiche, presentano la capacità spontanea di adsorbire gli acidi nucleici. In vista di tale scoperta, l'invenzione fornisce così un procedimento semplificato per l'effettuazione di saggi biologici comprendenti l'estrazione/purificazione di acidi nucleici da un campione biologico, ed altresì l'amplificazione dell'acido nucleico, con l'impiego di un singolo dispositivo microfluidico.

Costituisce così un oggetto dell'invenzione un procedimento per l'effettuazione di un saggio dia-

agnostico/biologico avente le caratteristiche quali definite nelle rivendicazioni che seguono.

A seguito dell'invenzione, si è rilevato che l'adsorbimento di acidi nucleici su superfici di PDMS è spontaneo e non necessita di alcun tipo di trattamento o modifica superficiale per essere promosso. Conseguentemente, l'operazione di estrazione/purificazione del DNA può essere eseguita ponendo il campione biologico, precedentemente lisato o opzionalmente in una soluzione di lisi, a diretto contatto con superfici di PDMS, ove tali superfici non sono funzionalizzate o modificate preventivamente al contatto con il campione biologico.

Nell'ambito dell'invenzione si contempla così l'impiego di superfici di PDMS che siano:

- strati bidimensionali (ove con tale termine si intendono strati molto sottili) usati come ricoprimento di altri materiali, nella forma di superfici piane o con piccole curvature (ad esempio rivestimenti interni di dispositivi microfluidici) o a forma circolare o sferica, con alte curvature (ad esempio rivestimento di materiali in forma di beads o capillari);
- superfici di parti massive in PDMS piane o a piccola curvatura (ad esempio dispositivi micro-

fluidici o parti di essi) o a forma circolare o sferica con alte curvaturei (ad esempio beads o capillari).

Pertanto, in una prima forma di attuazione, tali superfici di PDMS possono far parte di dispositivi microfluidici fabbricati con diversi materiali, quali silicio, silicio-vetro, vetro, metalli compositi, ossidi, polimeri, polimeri termoplastici, polimeri termoindurenti, elastomeri, elastomeri termoplastici.

In questi casi, il PDMS può:

- ricoprire le superfici interne del dispositivo ottenuto secondo la tecnologia prevista per la classe di materiali utilizzati per la fabbricazione;
- può altresì costituire strutture ausiliarie inserite nella struttura fluidica primaria al solo scopo di aumentare la superficie specifica interna di PDMS in grado di adsorbire spontaneamente DNA.

Il massimo beneficio che il sistema, oggetto della presente invenzione, è in grado di apportare in termini di riduzione di costi e tempi di analisi, si ottiene costruendo sistemi microfluidici utilizzando unicamente PDMS. Il dispositivo interamente realizzato in polidimetilsilossano, mediante



processo di casting in stampo aperto, permette una significativa riduzione del costo, rispetto sia a materiali tradizionali quali vetro e silicio, sia ad altri materiali polimerici quali le resine e i materiali termoplastici.

In una forma di attuazione preferita, il dispositivo è formato da una parte principale in cui sono definite le diverse funzionalità (chip), e da una base piana formata da una sottile membrana che consente la chiusura degli elementi fluidici definiti nel corpo principale attraverso un processo di incollaggio (bonding) mediante uno strato sottile dello stesso materiale (PDMS) reticolato in sede. Inoltre, i processi di lisi cellulare del campione di sangue, di purificazione/estrazione del DNA, di PCR ed infine di rivelazione, vengono eseguiti nella stessa struttura senza bisogno di zone distinte per le diverse operazioni. Potendo utilizzare sangue intero (ma non solo) come campione biologico, il sistema proposto risulta adatto alla diagnosi di malattie geniche, oltre che alla rivelazione di patogeni.

Questo, unitamente alla semplificazione costruttiva e all'abbattimento dei costi, caratteristiche della proposta, lo rende adatto allo svilup-

po di sistemi "point-of-care". La purificazione del DNA avviene sfruttando la semplice interazione chimico-morfologica con il materiale del dispositivo, e la reazione di PCR viene effettuata direttamente sul DNA adsorbito sulle pareti del dispositivo, senza la necessità di particolari trattamenti con agenti passivanti per poter essere svolta efficacemente.

L'invenzione consiste nell'utilizzo innovativo di un sistema miniaturizzato per la rivelazione di patologie a partire da quantità ridotte di fluidi biologici (circa 7  $\mu$ l di sangue).

Il principale componente del dispositivo è un chip realizzato in PDMS accoppiato ad una base (membrana) nello stesso materiale, eventualmente ottenuta stendendo un velo sottile (ad esempio per spinning) su una superficie rigida, liscia e più conduttiva termicamente rispetto al polimero (ad esempio silicio). La fabbricazione sfrutta la semplice e poco costosa tecnologia di casting (colata in stampo aperto).

In seguito alla reticolazione ed estrazione, le due parti (base e chip) vengono incollate mediante un velo sottile dello stesso polimero, interposto tra la base e il chip, e quindi fatto reticolare.

Tale chip deve assolvere la funzione di contenere il volume di reazione, senza interferire nelle reazioni biologiche e garantendo ermeticità in tutte le fasi delle reazioni.

Il processo di estrazione del DNA può essere attuato utilizzando circa 5-10  $\mu$ l di materiale biologico, in meno di trenta minuti. Il sistema di estrazione non necessita di trattamenti superficiali del dispositivo, ma sfrutta il naturale adsorbimento del materiale biologico sulle pareti del dispositivo stesso.

I sistemi convenzionali di PCR richiedono l'intervento di personale specializzato per il loro utilizzo e sono condotti impiegando tubi di reazione in polipropilene con volumi di 25  $\mu$ l o maggiori che sono caratterizzati da una bassa conducibilità e da un'alta inerzia termica. L'utilizzo della base in silicio, permette di abbreviare i tempi per la reazione di PCR grazie alla miglior conducibilità termica del materiale.

La rivelazione in fluorescenza avviene tramite l'impiego di sonde marcate, e può essere integrata direttamente nel sistema, effettuando un monitoraggio on-line del segnale fluorescente e/o una misurazione al termine del processo di amplificazione

direttamente sul dispositivo.

Il sistema è concepito per permettere diagnosi in maniera veloce ed economica; ciò trova applicazione negli *screening* di massa, nelle analisi *in loco*, ad esempio in favore dei degenti ospedalieri per individuare infezioni nosocomiali direttamente al letto del paziente.

Nei disegni annessi, forniti a titolo di esempio non limitativo:

- la fig. 1 è un'immagine di un dispositivo dimostrativo, realizzato interamente in PDMS;
- la fig. 2A è una vista in sezione verticale del dispositivo della fig. 1; e
- la fig. 2B è una vista schematica dall'alto.

Il dispositivo (o chip) microfluidico è formato da due parti:

1. un corpo principale 2, nel quale sono definite le funzionalità del chip; e
2. una base 4 che serve per chiudere il dispositivo, garantendo il confinamento dei fluidi nel volume di lavoro.

Entrambe le parti vengono fabbricate in PDMS attraverso un processo di colata in stampo aperto (casting) del polimero precedentemente mescolato con l'agente reticolante. Il PDMS è un polimero e-

lastomerico, disponibile come prodotto bi-componente, che viene preparato miscelando il polimero ad un agente reticolante.

Dopo degasamento si versa la miscela in uno stampo con geometria duale rispetto a quella dell'oggetto che si vuole ottenere, si lascia degassare e si riscalda il materiale nello stampo ad una temperatura compatibile con quella del materiale che forma lo stampo stesso (usualmente 75°C per 45 minuti) oppure si conduce la reazione a temperatura ambiente per almeno 24 ore.

La composizione del PDMS finale, definita come il rapporto in peso di polimero rispetto all'agente reticolante può essere scelta in base a caratteristiche finali d'impiego, quali ad esempio la rigidità. Per i dispositivi fabbricati a titolo di esempio per la presente invenzione, si è scelto di utilizzare, a puro fine dimostrativo, una composizione pari a 10 parti in peso di polimero e 1 di agente reticolante (10:1).

Il mescolamento è eseguito per via manuale. Il polimero così ottenuto viene colato negli stampi e sottoposto a riscaldamento al fine di promuovere la reazione di reticolazione. Il materiale viene quindi estratto dallo stampo e può essere utilizzato.

I dispositivi preparati per questa dimostrazione sono caratterizzati dalla presenza di una sola camera 6 di reazione con forma all'incirca ellittica, connessa a due fori 8, 10 (inlet e outlet), disposti lungo l'asse maggiore della struttura (si veda l'immagine proposta nella fig. 1). Il volume totale disponibile in questo dispositivo dimostrativo è pari a 15  $\mu$ l.

Lo stampo utilizzato per questa dimostrazione è stato fabbricato con lavorazione meccanica ad alta precisione mediante fresa a controllo numerico. Il volume di lavoro, utilizzando questa tecnologia, e conservando invariata la forma della camera, può scendere sino a 10  $\mu$ l. Un'ulteriore riduzione si può ottenere utilizzando oli buffer compatibili con le soluzioni, in modo da occupare con quegli oli i canali (minimo volume 5  $\mu$ l).

Un'ulteriore riduzione di volume si può ottenere fabbricando lo stampo attraverso l'impiego di microtecnologie e modificando la forma della zona di lavoro da camera a canale microfluidico. In letteratura c'è evidenza di volumi minimi fabbricabili in dispositivi interamente costituiti di PDMS via soft-lithography, dell'ordine di 1.75  $\mu$ l [A. Ranjit Prakash et al. *Sensors and Actuators B* 113 (2006)

398-409].

La base del dispositivo può essere fabbricata come:

- membrana self-standing, attraverso processo di casting in stampo avente struttura duale di quella di interesse;
- film depositato e assottigliato (con utensili come, ad esempio, spatole) o via spinning su una superficie di supporto rigido, che conduca il calore in modo più efficiente del PDMS (metalli, compositi, silicio, silicio-vetro, vetro).

Le due parti (corpo e base) vengono unite mediante layer di PDMS non-reticolato posizionato tra il corpo e la base e poi lasciato reticolare (ma altre modalità di bonding possono essere scelte).

Per il processo di estrazione e di amplificazione del DNA non sono necessari trattamenti del dispositivo. Il dispositivo può essere alimentato con un materiale biologico costituito da acidi nucleici precedentemente purificati, o un materiale biologico includente acidi nucleici in un solvente o in una soluzione di lisi; preferibilmente, tale materiale non comprende solventi o Sali caotropici. Il materiale biologico viene incubato sul dispositivo e, grazie alla struttura chimica e morfologica

della superficie del PDMS, viene assorbito su di esso. I lavaggi, effettuati per eliminare componenti che potrebbero interferire con la successiva reazione di amplificazione, lasciano disponibile il materiale biologico sulle pareti del dispositivo.

Il dispositivo permette di ottenere DNA sufficientemente purificato da detriti cellulari, emoglobina, proteine, lipidi ed altro materiale proveniente dalla lisi delle cellule del sangue senza la necessità di trattamenti superficiali, ed utilizzabile senza ulteriori processi di purificazione nelle successive analisi.

Questo avviene con l'utilizzo di una minima quantità di materiale biologico di partenza, ridotte quantità di reagenti e soprattutto una ridotta durata del processo di estrazione (30 minuti) rispetto alle circa 2-3 ore necessarie per un'estrazione in condizioni standard che utilizza volumi dell'ordine di almeno decine di  $\mu\text{l}$ .

La reazione di amplificazione viene effettuata direttamente sul materiale biologico adsorbito sulla superficie del dispositivo, che è sufficientemente esposto e disponibile per la reazione, senza la necessità di staccarlo dalle pareti. Inoltre, la reazione di amplificazione avviene senza la neces-



sità di utilizzare agenti passivanti quali BSA (bovine serum albumin) o PVP (polivinilpirrolidone), comunemente utilizzati su questo tipo di materiale.

Mediante un opportuno protocollo di rivelazione fluorescente è inoltre possibile utilizzare il microchip per la determinazione specifica dell'aumento del DNA amplificato. Nella miscela della reazione di PCR possono essere presenti due sonde specifiche, ciascuna legata ad un diverso fluoroforo oppure può essere presente una sola sonda specifica o un indicatore fluorescente dell'amplificazione. Tale sistema permette, attraverso l'analisi della fluorescenza rilevata alla fine della reazione di PCR, di definire l'identità del nucleotide indagato.

Ciò pertanto si presta ad essere impiegato in qualsiasi tipo di screening mutazionale (trova quindi impiego nella diagnostica genetica relativa alle malattie genetiche ereditarie quali fibrosi cistica, emocromatosi, sordità, anemia mediterranea, condroplasia, ecc.), nonché nelle analisi di genotipizzazione (studio dei polimorfismi nucleotidici singoli o SNP) relative a studi di suscettibilità a malattie dai tratti complessi (obesità, malattie cardiovascolari, osteoporosi, ecc.) e, poten-

zionalmente, si apre alla possibilità di effettuare studi di espressione genica su un buon numero di campioni, monitorando la crescita di fluorescenza durante la reazione di PCR, in tempo reale.

### **Dettagli di esempi di implementazione**

#### Esempio 1: Purificazione di acidi nucleici

Il sistema di purificazione ed il relativo protocollo descritti in questo esempio sono stati messi a punto su microchip con volume di circa 15  $\mu$ l, utilizzando inizialmente DNA genomico umano purificato. L'efficienza di estrazione dei dispositivi è stata verificata con quantità di DNA genomico purificato fino a 100 ng.

Dato l'esito positivo del processo di estrazione e considerato che nella quantità di sangue da utilizzare sono presenti circa 200 ng di DNA, si è proceduto con le prove usando sangue intero, mettendo a punto un protocollo di lisi in chip.

7  $\mu$ l di materiale biologico (sangue intero in EDTA e congelato) sono stati uniti a 7  $\mu$ l di soluzione di lisi non contenente sali o solventi caotropici e 0,7  $\mu$ l di proteinasi K ed inseriti nel chip. Il chip è stato successivamente alloggiato nel termociclatore apposito e si è proceduto ad applicare il seguente protocollo termico: innalzamen-

to a 56°C, permanenza a questa temperatura per 10 minuti.

Alla fine del ciclo termico il micro-chip viene tolto dal termociclatore ed il materiale biologico lisato viene lasciato adsorbire per 20 minuti a temperatura ambiente sulle pareti del dispositivo.

Al termine dell'incubazione viene lavato il dispositivo inserendovi 15 µl di acqua ultrapura per almeno 5 volte consecutivamente, rimuovendo infine l'acqua rimasta in contatto. Al termine del processo di lavaggio, il DNA che rimane adsorbito sulle pareti del dispositivo è disponibile per il successivo processo di amplificazione PCR senza la necessità di doverlo staccare dalle pareti.

#### Esempio 2: PCR

Il DNA usato come stampo proviene dal processo di purificazione descritto nell'esempio 1 e viene utilizzato direttamente nella miscela di PCR, senza la necessità di staccarlo dalle pareti del dispositivo, dando luogo a prodotti ben visibili al termine dell'amplificazione. La reazione di PCR viene quindi condotta nel termociclatore, con il seguente protocollo, qui di seguito descritto a titolo di esempio.

Una miscela standard di reagenti PCR contiene

2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTPs, 0,5 µM di ogni primer C282Y forward e reverse, 1,5U di HotStartTaq polymerase Roche in 15 µl. Il protocollo usato è composto dai seguenti cicli: 1 ciclo a 95°C per 5 minuti, 35 cicli a 95°C per 30 secondi, 62°C per 30 secondi e 72°C per 30 secondi, 1 ciclo a 72°C per 7 minuti. La regione genica amplificata in questo esempio è correlata ad una mutazione puntiforme che causa l'emocromatosi.

Al termine della reazione la soluzione ottenuta viene utilizzata in questo esempio in una cella elettroforetica per un controllo della purezza del DNA così ottenuto (gel di agarosio al 2% contenente etidio bromuro). In alternativa, utilizzando un protocollo apposito descritto nel prossimo punto, viene rivelato monitorando un segnale di fluorescenza.

### Esempio 3: Rivelazione in fluorescenza

Attualmente, la funzionalità del sistema di rivelazione in fluorescenza è stata dimostrata impiegando i medesimi chip PCR utilizzati per la rivelazione elettroforetica, che utilizzano un volume di reazione di circa 15 µl.

Come sistema di eccitazione e rivelazione del segnale fluorescente è stato impiegato un microscopio

pio a fluorescenza con le seguenti caratteristiche: obiettivo 10x (area acquisita  $1000 \times 800 \mu\text{m}^2$ ), lampada a mercurio 120W, filtro eccitazione passabanda 480/40 nm, filtro emissione passabanda 527/30 nm, tempo di integrazione circa 0,6 sec.

I valori di fluorescenza sono stati misurati su di un'area di circa  $400.000 \mu\text{m}^2$ , che corrisponde ad una porzione ridotta del microchip utilizzato e quindi ad un volume di reazione inferiore ai 500 nl. Sono state utilizzate sonde fluorescenti del tipo TaqMan®, complementari ad una regione interna della sequenza genica da amplificare la cui presenza induce un segnale fluorescente in seguito alla repressione di un quenching di fluorescenza.

Ne risulta quindi una rivelazione specifica dell'amplificato che si desidera monitorare, anche in Real-Time. Il protocollo utilizzato e di seguito descritto, è un esempio di quelli sperimentati con successo negli esperimenti che integrano PCR e detection.

Una miscela standard di reagenti PCR contiene 2,5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,2 mM dNTPs, soluzione madre contenente primer for e rev e le sonde TaqMan concentrata 1X (TaqMan® SNP Genotyping Assay), 1 Unità di

HotStartTaQ polymerase Roche. Il protocollo usato è composto dai seguenti cicli: 1 ciclo a 95°C per 10 minuti, 40 cicli a 92°C per 15 secondi, 60°C per 1 minuto.

Nel nostro caso le misure sono state eseguite sia comparando il segnale di fluorescenza di uno stesso chip prima e dopo la PCR sia confrontando il segnale di chip contenenti la miscela sopra descritta ("positivi") con quello di chip di controllo ("negativi": ad esempio privi di template, o in alternativa completi di tutti i reagenti, ma non sottoposti ai cicli termici di PCR). I valori tipici rilevati passano da circa 1.000 (nei controlli negativi) a circa 10.000 unità arbitrarie per i campioni positivi, con incremento del segnale di circa 10 volte e quindi facilmente rivelabile.

#### **AREE DI APPLICAZIONE PRINCIPALI**

Il sistema proposto, integrando le funzioni di:

- 1) lisi cellulare e purificazione del DNA;
- 2) amplificazione mediante PCR; e
- 3) sistema di rilevazione on-line della fluorescenza,

potrà essere impiegato nella diagnosi di patologie causate da mutazioni. Specifiche coppie di primer localizzate a cavallo della zona del gene indagato

per la presenza/assenza della mutazione, un sistema di coppie di sonde fluorescenti atte a definire l'identità del nucleotide nella posizione in esame, potranno essere impiegate nella reazione di PCR miniaturizzata; l'analisi del segnale di fluorescenza presente dopo la fase di amplificazione genica, fornirà l'identità del nucleotide in questione e quindi la presenza o meno della mutazione.

Il sistema si presta bene alla parallelizzazione del processo; in tal senso, mediante reazioni di amplificazione multiple potranno essere caratterizzati, per la medesima mutazione, molteplici individui o, viceversa, potranno essere saggiate contemporaneamente più mutazioni per soggetto.

Le applicazioni del sistema in oggetto sono numerose e riguardano tutte le patologie ereditarie causate da mutazioni del codice genetico (fibrosi cistica, emocromatosi, sordità, anemia mediterranea, condroplasia, Corea di Huntington, ecc.); l'economicità dell'analisi, la semplicità con cui può essere recuperato il campione ematico dal paziente, la rapidità d'esecuzione rendono il sistema impiegabile in ambito ospedaliero.

Inoltre, la possibilità di individuare l'identità nucleotidica in uno specifico punto del codice

genetico rende il sistema utile alla genotipizzazione di un certo numero di individui e quindi rende possibile estrapolare informazioni relative alle cosiddette patologie dai tratti complessi, cioè quelle patologie per cui non vale l'assioma "una mutazione = una patologia", ma che piuttosto traggono origine da una somma di cause tra cui lo stile di vita, fattori ambientali e non ultime le cause genetiche; specifici pattern di polimorfismi potrebbero essere predisponenti per alcune di tali patologie (obesità, malattie cardiovascolari, osteoporosi, tumori e altre).

Più in generale quindi, il dispositivo oggetto di questo brevetto, troverebbe impiego nell'ambito dei Test Predittivi (riguardo a malattie complesse e comuni) che identificano situazioni di suscettibilità o di resistenza nei confronti delle patologie in esame; questo tipo di determinazione non conferisce nessuna certezza a riguardo del manifestarsi della malattia, piuttosto dà indicazioni circa un aumento del rischio di svilupparla, in concomitanza con fattori ambientali scatenanti.

Inoltre resta inteso che qualsiasi applicazione e ambito che preveda l'impiego di una reazione di PCR potrà trarre vantaggio dal sistema in oggetto,



in una modalità economica e veloce. Tutti gli ambiti che traggono informazioni dalla genotipizzazione (medicina molecolare, farmacogenomica, nutrigenomica, medicina personalizzata) potranno avvalersi del dispositivo oggetto di questo brevetto, con il singolo paziente come fruitore d'elezione; il dispositivo infatti non è pensato per determinazioni su un numero illimitato di pazienti, ma, viceversa, per dare vantaggio alla diagnosi personalizzata.

RIVENDICAZIONI

1. Procedimento per l'effettuazione di un saggio diagnostico, comprendente almeno uno stadio di estrazione e/o purificazione di acido nucleico da un campione biologico ed uno stadio di amplificazione ed opzionalmente rivelazione dell'acido nucleico, detti stadi essendo effettuati in un singolo dispositivo microfluidico, comprendente almeno una camera o canale microfluidico avente almeno una superficie a diretto contatto con il campione biologico, suscettibile di adsorbire l'acido nucleico, caratterizzato dal fatto che detta almeno una superficie è una superficie di polidimetilsilossano posta a diretto contatto con il campione biologico, detta superficie essendo priva di rivestimenti e non essendo funzionalizzata o modificata preventivamente al contatto con il campione biologico.

2. Procedimento secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto che lo stadio di amplificazione dell'acido nucleico viene eseguito sull'acido nucleico adsorbito su detta almeno una superficie di adsorbimento senza causarne il desorbimento ed in assenza di un trattamento di passivazione di detta almeno una superficie di adsorbimento.

3. Procedimento secondo le rivendicazioni 1 o 2,

caratterizzato dal fatto che lo stadio di estrazione/purificazione e lo stadio di amplificazione dell'acido nucleico sono eseguiti nella stessa camera o canale microfluidico, senza richiedere lo spostamento dell'acido nucleico dalla superficie di adsorbimento ad un'altra superficie di detta camera o canale.

4. Procedimento secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 3, caratterizzato dal fatto che detto stadio di estrazione/purificazione di acido nucleico in detto dispositivo microfluidico è effettuato mediante iniezione in detto dispositivo di un campione biologico in una soluzione di lisi non contenente sali o solventi caotropici e sottoponendo il campione iniettato a trattamento termico atto a determinare la lisi cellulare del campione biologico.

5. Procedimento secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 4, caratterizzato dal fatto che detto dispositivo microfluidico è un dispositivo formato integralmente da un primo ed un secondo substrato, definenti congiuntamente un canale microfluidico, formato integralmente da polidimetilsilossano.

6. Procedimento secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 4, caratterizzato dal fatto che detto dispositivo microfluidico è formato da un primo ed

un secondo substrato, definenti congiuntamente un canale microfluidico, ove detto primo e secondo substrato sono formati da un materiale scelto tra silicio, silicio-vetro, materiali metallici, ceramici o polimerici, presentanti superfici destinate al contatto con il campione biologico, rivestite di polidimetilsilossano.

7. Procedimento secondo la rivendicazione 6, caratterizzato dal fatto che detto dispositivo microfluidico include in detta camera o canale microfluidico strutture ausiliarie interamente costituite di polidimetilsilossano o con superfici rivestite di polidimetilsilossano.

8. Procedimento secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, caratterizzato dal fatto che detto dispositivo microfluidico comprende una singola camera o canale microfluidico.

9. Impiego di polidimetilsilossano (PDMS) non modificato come materiale per l'adsorbimento di acidi nucleici in dispositivi microfluidici predisposti per saggi di estrazione/purificazione e/o amplificazione di acidi nucleici.

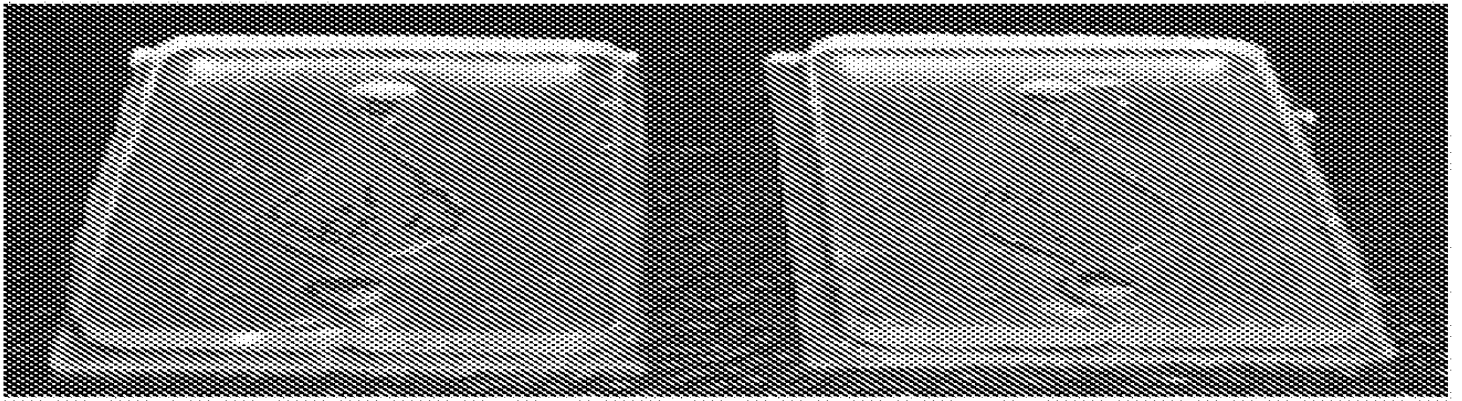


FIG.1

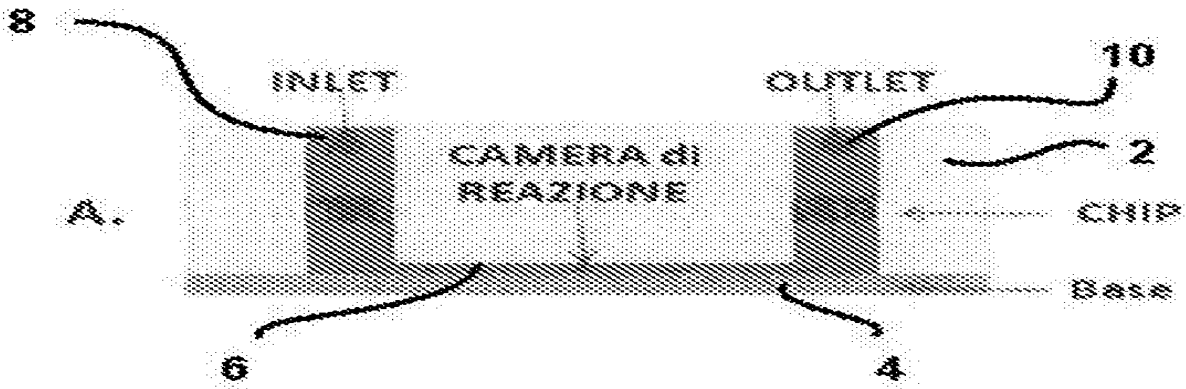


FIG.2A

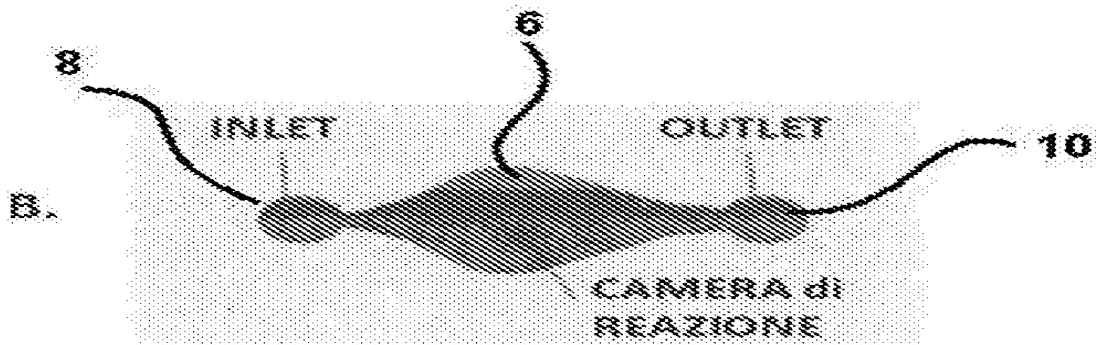


FIG.2B