

DISPOSITIVO MICROFLUIDICO, PARTICOLARMENTE PER LA RIVELAZIONE DI VARIANTI
GENICHE

Original

DISPOSITIVO MICROFLUIDICO, PARTICOLARMENTE PER LA RIVELAZIONE DI VARIANTI GENICHE / Canavese, Giancarlo; Castagna, Riccardo; Cocuzza, Matteo; Gasparini, P.; Giuri, Eros; Mantero, G.; Marasso, SIMONE LUIGI; Perrone, Denis; Pirri, Candido; Quaglio, Marzia; Vallini, I.. - (2011).

Availability:

This version is available at: 11583/2588779 since: 2021-01-14T12:11:56Z

Publisher:

Published

DOI:

Terms of use:

openAccess

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)

ITALIA - BREV. DI INVENZIONE

Domanda N. TO2009A000915
depositata il 25 Novembre 2009

a nome: POLITECNICO DI TORINO; CONSIGLIO NAZIONALE
DELLE RICERCHE - INFN; UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI
TRIESTE; BIODIVERSITY S.P.A.

Domanda di Brevetto per Invenzione Industriale

Richiedente/i

Denominazione: **POLITECNICO DI TORINO;**

Natura Giuridica: **PG (Persona Giuridica);**

Codice Fiscale: **00518460019;**

Indirizzo: **CORSO DUCA DEGLI ABRUZZI 24; Localita' Residenza: ; Comune: TORINO; Cap: 10129;**

Provincia Residenza: **TORINO (TO); Stato: ITALIA ();**

Denominazione: **CONSIGLIO NAZIONALE DELLE RICERCHE - INFN ISTITUTO NAZIONALE PER LA FISICA DELLA MATERIA;**

Natura Giuridica: **PG (Persona Giuridica);**

Codice Fiscale: **;**

Indirizzo: **CORSO F. PERRONE, 24; Localita' Residenza: ; Comune: GENOVA GE; Cap: 16152; Provincia**

Residenza: (); Stato: ITALIA ();

Denominazione: **UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI TRIESTE;**

Natura Giuridica: **PG (Persona Giuridica);**

Codice Fiscale: **;**

Indirizzo: **PIAZZALE EUROPA 1; Localita' Residenza: ; Comune: TRIESTE; Cap: 34127; Provincia**

Residenza: TRIESTE (TS); Stato: ITALIA ();

Denominazione: **BIODIVERSITY S.P.A.;**

Natura Giuridica: **PG (Persona Giuridica);**

Codice Fiscale: **02265580981;**

Indirizzo: **VIA CORFU' 71; Localita' Residenza: ; Comune: BRESCIA; Cap: 25124; Provincia Residenza:**

BRESCIA (BS); Stato: ITALIA ();

Recapito

Cognome/Denominazione: **;** *Nome:* **;**

Indirizzo recapito: **;** *Localita' Recapito:* **;** *Comune:* **;** *Provincia:* **();** *Cap:* **;**

Titolo

Descrizione: **DISPOSITIVO MICROFLUIDICO, PARTICOLARMENTE PER LA RIVELAZIONE DI VARIANTI GENICHE**

Inventori Designati

Cognome: **COCUZZA; Nome: MATTEO; Nazionalita': ITALIANA**

Cognome: **PIRRI; Nome: CANDIDO FABRIZIO; Nazionalita': ITALIANA**

Cognome: **MARASSO; Nome: SIMONE; Nazionalita': ITALIANA**

Cognome: **CANAVESE; Nome: GIANCARLO; Nazionalita': ITALIANA**

Cognome: **GIURI; Nome: EROS; Nazionalita': ITALIANA**

Cognome: **QUAGLIO; Nome: MARZIA; Nazionalita': ITALIANA**

Cognome: **PERRONE; Nome: DENIS; Nazionalita': ITALIANA**

Cognome: **CASTAGNA; Nome: RICCARDO; Nazionalita': ITALIANA**

Cognome: **GASPARINI; Nome: PAOLO; Nazionalita': ITALIANA**

Cognome: **MANTERO; Nome: GIOVANNI; Nazionalita': ITALIANA**

Cognome: **VALLINI**; Nome: **IVAN**; Nazionalita': **ITALIANA**

Classi Proposte

Sezione: **B**; Classe: **01**; Sottoclasse: **L**; Gruppo: **3**;

Mandatario abilitato presso UIBM

Numero Iscrizione Albo: **00435**

Cognome: **RAMBELLI** Nome: **PAOLO**

Denominazione Studio: **JACOBACCI & PARTNERS S.P.A.**

Indirizzo: **CORSO EMILIA, 8**

Comune: **TORINO** Cap: **10152** Provincia: **TORINO**

Numero Domicilio Professionale: **032**

Annotazioni Speciali

Descrizione: ***LETTERE D'INCARICO SEGUONO**

Descrizione: ***TRADUZIONE IN INGLESE DELLE RIVENDICAZIONI SEGUE**

Descrizione: ***I TITOLARI PARTECIPANO AI DIRITTI SUL BREVETTO NELLE SEGUENTI MISURE:
(SEGUE)**

Descrizione: ***(CONT.) 51% POLITECNICO DI TORINO; 19% CONSIGLIO NAZIONALE DELLE RICERCHE
- INFIM ISTITUTO (SEGUE)**

Descrizione: ***(CONT.) NAZIONALE PER LA FISICA DELLA MATERIA; 15% UNIVERSITA' DEGLI STUDI
DI TRIESTE; (SEGUE)**

Descrizione: ***(CONT.) 15% BIODIVERSITY S.P.A.**

Documentazione Allegata o con Riserva di Presentazione

Tipo Documento: **Tavole Disegno**; N. Es. All. : **1**; N.Es.Ris.: **0**; N. Pag. per Esemplare: **7**;

Tipo Documento: **Descrizione/Rivendicazione**; N. Es. All. : **1**; N.Es.Ris.: **0**; N. Pag. per Esemplare: **22**;

Tipo Documento: **Attestato di versamento**; **SI**;

Attestato di Versamento

Importo Pagato: **50.00** Euro; Importo in Lettere: **CINQUANTA/00** Euro;

Del Presente Atto si Richiede Copia Autentica

Data Compilazione: 2009-11-25

DESCRIZIONE dell'invenzione industriale dal titolo:
"Dispositivo microfluidico, particolarmente per la
rivelazione di varianti geniche"

Di: POLITECNICO DI TORINO, nazionalità italiana,
Corso Duca degli Abruzzi 24, 10129 TORINO;

di: CONSIGLIO NAZIONALE DELLE RICERCHE - INFN ISTI-
TUTO NAZIONALE PER LA FISICA DELLA MATERIA, nazio-
nalità italiana, Corso F. Perrone 24, 16152 GENOVA;

di: UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI TRIESTE, nazionalità
italiana, Piazzale Europa 1, 34127 TRIESTE; e

di: BIODIVERSITY S.p.A., nazionalità italiana, Via
Corfù 71, 25124 BRESCIA.

Inventori designati: Matteo COCUZZA, Candido Fabri-
zio PIRRI, Simone MARASSO, Giancarlo CANAVESE, Eros
GIURI, Marzia QUAGLIO, Denis PERRONE, Riccardo CA-
STAGNA, Paolo GASPARINI, Giovanni MANTERO, Ivan
VALLINI

Depositata il: 25 Novembre 2009

DESCRIZIONE

La presente invenzione si riferisce ad un di-
spositivo microfluidico, particolarmente del tipo
denominato con il termine lab-on-a-chip, noto in
letteratura con l'acronimo LOC, predisposto per
l'implementazione di un protocollo genomico.

In particolare, l'invenzione si riferisce ad un dispositivo microfluidico idoneo all'implementazione del protocollo genomico noto come APEX (Arrayed Primer Extension), utilizzato per la rivelazione di varianti geniche di singolo nucleotide a carico della molecola di DNA, quali mutazioni, polimorfismi e sostituzioni.

La tecnologia LOC, finalizzata a miniaturizzare un intero laboratorio di microbiologia molecolare in un dispositivo integrato e compatto, è in continua evoluzione ed espansione, grazie alle vantaggiose caratteristiche che offre in termini di costo di produzione, velocità di reazione, basso consumo di reagenti.

In vista dei vantaggi insiti in tale tecnologia, è di particolare interesse, e costituisce lo scopo primario della presente invenzione, fornire un LOC concepito come un modulo unico in grado di eseguire, tramite controlli esterni (idraulici, termici e ottici), passo dopo passo un protocollo completo, anche particolarmente complesso, come ad esempio il protocollo APEX, a partire dalla fase preparativa del campione (la più delicata e meno ripetibile con approcci tradizionali) fino a rendere disponibile il risultato finale o l'oggetto su

cui è possibile effettuare la rivelazione finale, particolarmente con l'impiego di dispositivi di rivelazione tradizionali da laboratorio, senza necessità di ricorrere a strumenti di lettura e di rivelazione progettati ad hoc.

In vista di tale scopo, costituisce oggetto dell'invenzione un dispositivo microfluidico avente le caratteristiche definite nelle rivendicazioni che seguono.

In particolare, il dispositivo microfluidico secondo l'invenzione si caratterizza per una struttura a due livelli, in cui, una parte del protocollo analitico, in particolare una parte preparativa del protocollo, viene effettuata in un circuito microfluidico realizzato in un primo piano o livello, mentre la parte terminale del protocollo comprendente la reazione (tipicamente la fase di ibridazione) che genera la formazione del prodotto analiticamente rilevabile viene eseguita in un secondo livello o piano della microstruttura.

Grazie a queste caratteristiche il circuito microfluidico di primo livello, in cui si svolge la parte preparativa, può essere realizzato mediante accoppiamento irreversibile di due o più substrati, che definiscono congiuntamente il circuito micro-

fluidico stesso e sono in grado di supportare pressioni anche molto elevate, mentre la camera di reazione finale di secondo livello può essere realizzata mediante accoppiamento reversibile di due o più substrati. In particolare, il secondo livello può essere realizzato mediante accoppiamento reversibile di un substrato con un vetrino tradizionale di laboratorio che reca sulla superficie una sonda o una matrice di sonde di rivelazione che, in fase terminale del protocollo, può essere agevolmente separato dal LOC e letto in un dispositivo tradizionale da laboratorio, come ad esempio, uno scanner per fluorescenza, o comunque con un approccio metodologico tradizionale (rivelazione colorimetrica) senza richiedere la predisposizione di uno strumento di lettura dedicato.

Ciò implica notevoli vantaggi dal punto di vista della portabilità commerciale del microdispositivo e della sua potenziale diffusione su larga scala, evitando all'utilizzatore di sostituire lo strumento di lettura, utilizzato per il passaggio finale del saggio genomico, già in uso con uno nuovo con relativi costi di acquisizione e training.

Ulteriori caratteristiche e vantaggi del dispositivo microfluidico secondo l'invenzione, ri-

sulteranno evidenti dalla descrizione dettagliata che segue, effettuata con riferimento ai disegni annessi, forniti a titolo di esempio non limitativo, in cui:

la figura 1 è una vista prospettica esplosa di un dispositivo microfluidico secondo l'invenzione con un circuito microfluidico semplificato illustrato per scopi puramente schematici;

la figura 2 è una vista dall'alto del dispositivo microfluidico di figura 1;

la figura 2A è una vista in sezione secondo la linea IIA-IIA di figura 2;

la figura 3 è un'illustrazione schematica delle fasi di procedimento produttivo di un dispositivo microfluidico secondo l'invenzione;

la figura 4 è una vista prospettica esplosa delle parti componenti di un dispositivo microfluidico secondo l'invenzione;

la figura 5 è una vista dall'alto di una parte componente la struttura di microdispositivo di figura 4;

la figura 6 è una rappresentazione schematica di un circuito microfluidico per l'attuazione di una parte preparativa del protocollo APEX; e

la figura 7 è una rappresentazione prospettica

di un microdispositivo secondo l'invenzione cui sono associati componenti per l'implementazione di un protocollo tipo APEX.

Con riferimento ai disegni, una struttura di minima di un dispositivo microfluidico secondo l'invenzione comprende un primo substrato 2 e un secondo substrato 4, accoppiati l'uno all'altro in relazione di sovrapposizione e definenti congiuntamente un circuito microfluidico 6 con almeno un ingresso 8a e 8b per l'immissione di un campione o di un reagente nel circuito microfluidico stesso e almeno un'uscita 10, altresì comunicante con il circuito 6. Nell'esempio illustrato, il circuito microfluidico è definito da un solco 6 ricavato nel substrato 2; il solco 6 può essere costituito da un incavo nel substrato 2 o può essere costituito da un'apertura passante attraverso il substrato, nel qual caso, il circuito microfluidico viene sigillato mediante accoppiamento con un ulteriore substrato 12.

I substrati 2, 4 ed eventualmente 12, sono preferibilmente accoppiati in modo irreversibile. Le modalità di accoppiamento irreversibile dipendono dalla natura chimica dei materiali costituenti i substrati stessi; un tipico accoppiamento irrever-

sibile può essere ottenuto, a titolo di esempio non esaustivo, mediante l'impiego di adesivi hot melt, adesivi UV, o attraverso meccanismi di bonding anodico, diretto o con utilizzo di leghe eutettiche.

Con 14 è indicato un terzo substrato disposto in relazione sovrapposta al substrato 4, nel quale è definita una camera di reazione 16 che è in comunicazione di fluido con il circuito microfluidico 6 tramite l'uscita 10. Preferibilmente, la camera di reazione 16 è definita da una costola anulare 18, sporgente dalla superficie generalmente piana del substrato 14 e presentante una superficie anulare superiore 20, avente la funzione di superficie di tenuta cooperante con un quarto substrato, rimovibile 22. La camera di reazione 16 comunica con l'uscita 10 tramite un'apertura 24 (figura 2A e figura 3) e presenta altresì un'uscita comunicante con l'esterno 26.

Il substrato rimovibile 22 presenta, sulla sua faccia rivolta verso la camera di reazione 16, un sensore o una funzionalizzazione o una pluralità di specie biologiche, particolarmente una pluralità di sonde biologiche disposte a matrice idonee per effettuare una rivelazione di un determinato analita presente nella camera di reazione.

La figura 3 è un'illustrazione schematica di un processo di fabbricazione del dispositivo, fornita a puro titolo esemplificativo.

La sequenza (a), fasi I a V, è riferita alla fabbricazione del circuito microfluidico o microcanale in un substrato di silicio; sono identificate le seguenti fasi operative:

I: substrato di silicio, ad esempio corrispondente al substrato 2 di figura 1;

II: attuazione di un processo fotolitografico per ottenere sul substrato uno strato di rivestimento di photoresist 2a costituente la maschera corrispondente al modello di circuito microfluidico che si intende ottenere;

III: lavorazione di erosione, ad esempio con micro-sabbatrice per ricavare nel substrato di silicio un circuito microfluidico 60;

IV: rimozione del photoresist e lavaggi;

V: ossidazione termica per ottenere uno strato superficiale di ossido di silicio 2b.

La sequenza (b), fasi I a V, si riferisce alla fabbricazione del chip microfluidico mediante accoppiamento, preferibilmente irreversibile, dei substrati 2 e 4, costituito nella fattispecie da un substrato di pyrex.

La sequenza comprende le seguenti fasi operative:

I: substrato iniziale di pyrex;

II: processo fotolitografico per ottenere un rivestimento superficiale di photoresist 2c fungente da maschera;

III: procedimento di erosione, ad esempio con microsabbiatrice per ottenere dal substrato 4 un condotto di uscita 10;

IV: rimozione del photoresist e lavaggi;

V: processo di incollaggio irreversibile dei substrati 2 e 4, ad esempio tramite tecnica di anodic bonding.

La sequenza (c), fasi I a III, è relativa alla fabbricazione della camera di reazione, del tipo indicato con 16 in figura 1.

Tale camera di reazione è preferibilmente ricavata in un substrato di polidimetilsilossano (PDMS). Il procedimento comprende le seguenti fasi operative:

I: stampo in polimetilmetacrilato (PMMA) formato da due semistampi ST1 ed ST2 definenti una cavità di stampo sagomata in conformità con il substrato e semplificato con 14 in figura 1;

II: versamento di PDMS nello stampo;

III: trattamento termico del substrato sagomato di PDMS così ottenuto.

La sequenza (d) si riferisce all'assemblaggio del LOC, formato dai substrati 2, 4 e 14, con un vetrino 22 recante, sulla sua superficie rivolta verso la camera microfluidica 16, sonde disposte a micromatrice.

Si intende che i materiali utilizzati per la realizzazione del dispositivo possono ampiamente variare rispetto a quelli identificati nello schema preparativo precedentemente riportato; è comunque preferibile che il substrato definente la camera di reazione terminale sia di materiale polimerico elastomerico suscettibile di adesione per contatto conformale con il substrato rimovibile 22. E' altresì preferibile che l'area di contatto e di adesione tra il substrato rimovibile 22 e il substrato 14 definente, congiuntamente con il substrato 22 la camera di reazione 16, sia limitato alla superficie superiore anulare di una costola 18 sporgente dal substrato 14, la quale costola funge così da garanzia di tenuta fra i due substrati ed è integrata con il substrato 14.

Possibili materiali alternativi per la realizzazione del dispositivo possono essere vetri o par-

ticolarmente polimeri (con particolare riferimento ai substrati 2, 12 e 4), sia elastomerici, che termoplastici o termoindurenti (o combinazioni di essi) lavorabili attraverso l'impiego di diverse tecnologie tra cui, a titolo di esempio non esaustivo, si citano: stampaggio, stampaggio a caldo, goffratura, stampaggio per iniezione, reticolazione termo-indotta, reticolazione foto-indotta, scrittura diretta tramite laser o altre tecniche.

Il dispositivo microfluidico oggetto dell'invenzione è particolarmente idoneo per l'implementazione del protocollo APEX; una forma di attuazione di un dispositivo progettato a tal fine, è illustrata nelle figure 4 a 7.

Con riferimento al circuito microfluidico di figura 6, il protocollo APEX, secondo una sua possibile declinazione, comprende le seguenti fasi operative:

a) le soluzioni di partenza sono il prodotto dell'amplificazione del DNA (prodotto PCR) e un mix contenente gli enzimi di frammentazione (Ung-Sap e Exo-Sap, ad esempio) necessari a frammentare il prodotto PCR, in siti predeterminati, per una sua più agevole analisi. La soluzione contenente il DNA amplificato (ad esempio con volume di 6 μ l) viene

iniettata nel circuito microfluidico attraverso l'ingresso 80a e la soluzione contenente l'enzima di frammentazione (volume 3 μ l) viene iniettata attraverso l'ingresso 80b;

b) le due soluzioni vengono, quindi, miscelate in una regione di miscelazione a serpentina, indicata nel suo insieme con 82;

c) la miscela di cui al punto b) viene, quindi, termostata a 37°C per un tempo sufficiente ad attivare gli enzimi di frammentazione;

d) il prodotto PCR così frammentato viene quindi termostatato a 95°C con il duplice scopo di disattivare gli enzimi e denaturare il DNA in una regione di termostatazione, indicata con 82;

e) il DNA denaturato viene quindi mescolato, in una regione di miscelazione a serpentina, indicata nel suo insieme con 84, con il cosiddetto mix APEX (dideossinucleotidi marcati con fluorofori o marcatori colorati ed enzima ThermoSequenase in un opportuno diluente, tipicamente acqua) alimentato tramite l'ingresso 80c;

f) la miscela di cui al punto e) viene convogliata tramite l'uscita 100 al secondo livello, nella camera di reazione 16, in cui a temperatura controllata di circa 56°C, viene favorito il contatto

della stessa (DNA target) con le sonde di oligonucleotidi (sonde di DNA) precedentemente immobilizzate o spottate sul substrato rimovibile 22;

g) durante l'incubazione si ottiene l'ibridazione del DNA target sulle sonde e la successiva estensione (assistita dall'azione dell'enzima *TermoSequenase*) della sonda di un solo oligonucleotide, quello che si accoppia in modo duale con il nucleotide sul target ove è eventualmente presente la mutazione (di singolo nucleotide per l'appunto);

h) si effettuano dei lavaggi (acqua, Alcanox, ...) anche a temperatura controllata per rimuovere tutto ciò che non è ibridizzato e i dideossinucleotidi marcati con fluorofori in eccesso;

i) si effettua la rivelazione o mediante fluorescenza (eccitazione laser con quattro lunghezze d'onda diverse per rivelare quale dei quattro possibili nucleotidi, marcati con fluorofori differenti, ha dato luogo all'estensione) o mediante colorimetria (processo analogo al precedente ma il cui risultato è uno spot colorato immediatamente visibile non fluorescente, che quindi non necessita di eccitazione laser per il rilevamento).

Come precedentemente indicato, le fasi a) a e) sono effettuate al primo livello del microdisposi-

tivo, mentre la fase g) è effettuata al secondo livello del microdispositivo. Le fasi h) e i) vengono generalmente effettuate in modo tradizionale sul substrato 22, dopo la sua rimozione dal LOC, tipicamente costituito da un vetrino da laboratorio su cui sono state precedentemente spottate le sonde, accoppiato in modo reversibile con il substrato 14.

In figura 4, sono illustrate le parti componenti di un dispositivo microfluidico per l'attuazione del protocollo APEX. Sono visibili, in particolare, i substrati 2 e 4 in accoppiamento tra loro, definenti il circuito microfluidico contenente le regioni di preparazione del protocollo, il substrato 14 definente la camera di reazione 16 connessa all'uscita del circuito microfluidico e interfacciata con il substrato rimovibile 22, il substrato rimovibile 22, illustrato in figura 5, unitamente alla traccia della costola o guarnizione 18, definente la camera di reazione; in figura 5, con S è indicata una pluralità di sonde di DNA spottate in posizione affacciata alla camera di reazione.

Con 90 e 92, in figura 4, sono indicati mezzi di serraggio meccanico e quindi di tipo reversibile, idonei ad assicurare la tenuta tra i substrati

e particolarmente tra i substrati 14 e 22.

La figura 7 illustra il dispositivo microfluidico secondo l'invenzione, ivi indicato nel suo insieme con 1, cui è associata la strumentazione e gli accessori per la conduzione del protocollo. Tale strumentazione comprende un dispositivo riscaldante 96, tipicamente a cella Peltier con associato dissipatore termico 98 ad essa collegato e il sistema di retroazione 102 per il controllo della cella Peltier.

Sono anche possibili soluzioni che integrano gli elementi riscaldanti (riscaldatori a film sottile) direttamente sul substrato.

La gestione fluidica è realizzata attraverso attuatori esterni 104, quali siringhe motorizzate o micropompe, oppure, tramite attuatori integrati direttamente sul dispositivo. Si intende che il sistema di gestione fluidica e termica può essere adattato in funzione dello specifico saggio o protocollo che si intende attuare; possono, inoltre, essere previsti mezzi di controllo per l'automazione della gestione fluidica e termica. L'unità di controllo potrà naturalmente essere programmata secondo modalità differenti (numero di analisi per unità di tempo, volume di campione su cui operare, intro-

duzione di controlli ed automatismi ad hoc, riduzione dei consumi per prodotti portatili) in funzione della specifica applicazione o del contesto di lavoro.

La tecnologia descritta per l'identificazione di sequenze nucleotidiche e di mutazioni permette di eseguire l'analisi su campioni biologici, partendo da qualsiasi organismo, riducendone i tempi e i costi e migliorandone prestazioni e ripetibilità. Rispetto a un approccio di implementazione del protocollo APEX tradizionale, si ottengono come conseguenze:

- una forte riduzione dei volumi: a riguardo, sono state testate versioni da 10 μ l e 5 μ l e il processo risulta ulteriormente scalabile verso il basso;
- una riduzione dei tempi, attualmente scalati di un fattore 50% rispetto all'approccio macroscopico;
- maggiore predisposizione all'automazione e con essa minor rischio di errore;
- budget energetico ridotto a causa della miniaturizzazione e dell'aumento del rapporto superficie volume, che rende l'implementazione estremamente adeguata anche a dispositivi diagnostici portatili POC (Point Of Care); possono, inoltre, essere utilizzati materiali di tipo usa e getta per cui il

microdispositivo si adatta a sistemi per la rivelazione di malattie su larga scala.

Il dispositivo microfluidico trova applicazione in molteplici aree tecniche, in particolare:

- area clinica comprendente principalmente lo screening genico di popolazione, screening genico di mutazioni responsabili di malattie, test di parentela, tipizzazioni in ambito medico e genetico, quali ad esempio quella dell'HLA (Human Leucocyte Antigen), tipizzazione del gruppo sanguigno, diagnosi di malattia da infezione, analisi di tipo forense, analisi neonatali su adulti;
- ricerca di base, comprendente studi genetici su uomo, topo, ratto, batteri e virus; inoltre, l'area di ricerca di base prevede l'analisi per la presenza di specifiche sequenze soprattutto l'identificazione di uno specifico nucleotide in una determinata posizione ed eventualmente la sua delezione od inserzione. In questo caso esistono due tipi principali di applicazioni: l'analisi per la genotipizzazione di SNPs (Single Nucleotide Polimorphisms, Polimorfismi di Singolo Nucleotide), quella per la ricerca e la caratterizzazione di nuove mutazioni;
- analisi genetiche per la predisposizione: nel caso degli SNPs, le analisi maggiormente utili ed e-

mergenti riguardano le analisi di predisposizione a condizioni o malattie di tipo complesso. Esempi di questo tipo di analisi sono la previsione di sviluppare malattie cardiovascolari, neurodegenerative, tumorali ma anche di longevità, obesità relativa al gusto nella definizione delle diete, tabagismo, ecc.;

- per la natura automatica e potenzialmente autonoma del modulo analitico che è oggetto dell'invenzione, è inoltre importante l'applicazione nell'area di bioterrorismo. In questo contesto, al dispositivo microfluidico può essere applicata l'identificazione genetica rapida e simultanea di agenti biologici.

RIVENDICAZIONI

1. Dispositivo microfluidico, per l'implementazione di un protocollo genomico, comprendente almeno un primo (2, 12) e un secondo (4) substrato, definenti congiuntamente un circuito microfluidico (6) con almeno un ingresso (8a, 8b) comunicante con detto circuito ed almeno un'uscita (10) comunicante con detto circuito, caratterizzato dal fatto che comprende almeno un terzo substrato (14), disposto in relazione sovrapposta a detto primo e secondo substrato e un quarto substrato (22), definente congiuntamente con detto terzo substrato una camera di reazione (16) terminale che comunica con detto circuito microfluidico (6) tramite detta uscita (10), ove detto quarto substrato è associato in sovrapposizione a detto terzo substrato in modo rimovibile e presenta una superficie rivolta verso detta camera di reazione (16) ove sono fissati uno o più sensori o sonde di rivelazione.

2. Dispositivo microfluidico secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto che detto primo e secondo substrato sono collegati tra loro in modo irreversibile.

3. Dispositivo microfluidico secondo le rivendicazioni 1 o 2, caratterizzato dal fatto che il ter-

zo substrato (14) comprende la costola anulare (18), integrale con detto terzo substrato, definente detta camera di reazione (16), l'area di contatto tra detto terzo (14) e quarto (22) substrato essendo limitata alla superficie di detta costola anulare (18) definente detta camera di reazione.

4. Dispositivo microfluidico secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 3, caratterizzato dal fatto che detto terzo substrato (14) comprende un'uscita (26), comunicante con detta camera di reazione (16).

5. Dispositivo microfluidico secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 4, caratterizzato dal fatto che detto terzo substrato (14) definente detta camera di reazione è di materiale polimerico elastomerico, particolarmente di polidimetilsilossano.

6. Dispositivo microfluidico secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, comprendente mezzi di fissaggio meccanico disimpegnabili, atti a collegare a tenuta detto terzo e quarto substrato a detto primo e secondo substrato.

7. Dispositivo microfluidico secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, caratterizzato dal fatto che detto quarto substrato comprende,

sulla sua superficie rivolta verso detta camera di reazione (16), una pluralità di sonde (S) disposte a matrice.

8. Dispositivo microfluidico secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, caratterizzato dal fatto che detto circuito microfluidico comprende almeno un primo (80a) ingresso e almeno un secondo ingresso (80b) per l'introduzione di reagenti in detto circuito, almeno una regione di miscelazione (82) a serpentina, almeno un terzo ingresso (80c) per l'introduzione di un reagente nel circuito microfluidico a valle di detta regione di miscelazione, almeno una seconda regione di miscelazione (84) a valle di detto terzo ingresso (80c) e almeno un'uscita (100) in comunicazione di fluido con detta camera di reazione.

9. Dispositivo microfluidico secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, comprendente associati mezzi riscaldanti (96, 98) e associati mezzi di pompaggio (104) per l'alimentazione di un campione e/o di reagenti a detto circuito microfluidico.

RIASSUNTO

Dispositivo microfluidico, per l'implementazione di un protocollo genomico, comprendente almeno un primo (2, 12) e un secondo (4) substrato, definenti congiuntamente un circuito microfluidico (6) con almeno un ingresso (8a, 8b) comunicante con detto circuito ed almeno un'uscita (10) comunicante con detto circuito, caratterizzato dal fatto che comprende almeno un terzo substrato (14), disposto in relazione sovrapposta a detto primo e secondo substrato e un quarto substrato (22), definente congiuntamente con detto terzo substrato una camera di reazione (16) terminale che comunica con detto circuito microfluidico (6) tramite detta uscita (10), ove detto quarto substrato è associato in sovrapposizione a detto terzo substrato in modo rimovibile e presenta una superficie rivolta verso detta camera di reazione (16) ove sono fissati uno o più sensori o sonde di rivelazione. Il dispositivo è particolarmente vantaggioso per l'implementazione del protocollo APEX, per la rivelazione di varianti geniche di singolo nucleotide.

(Figura 2A)

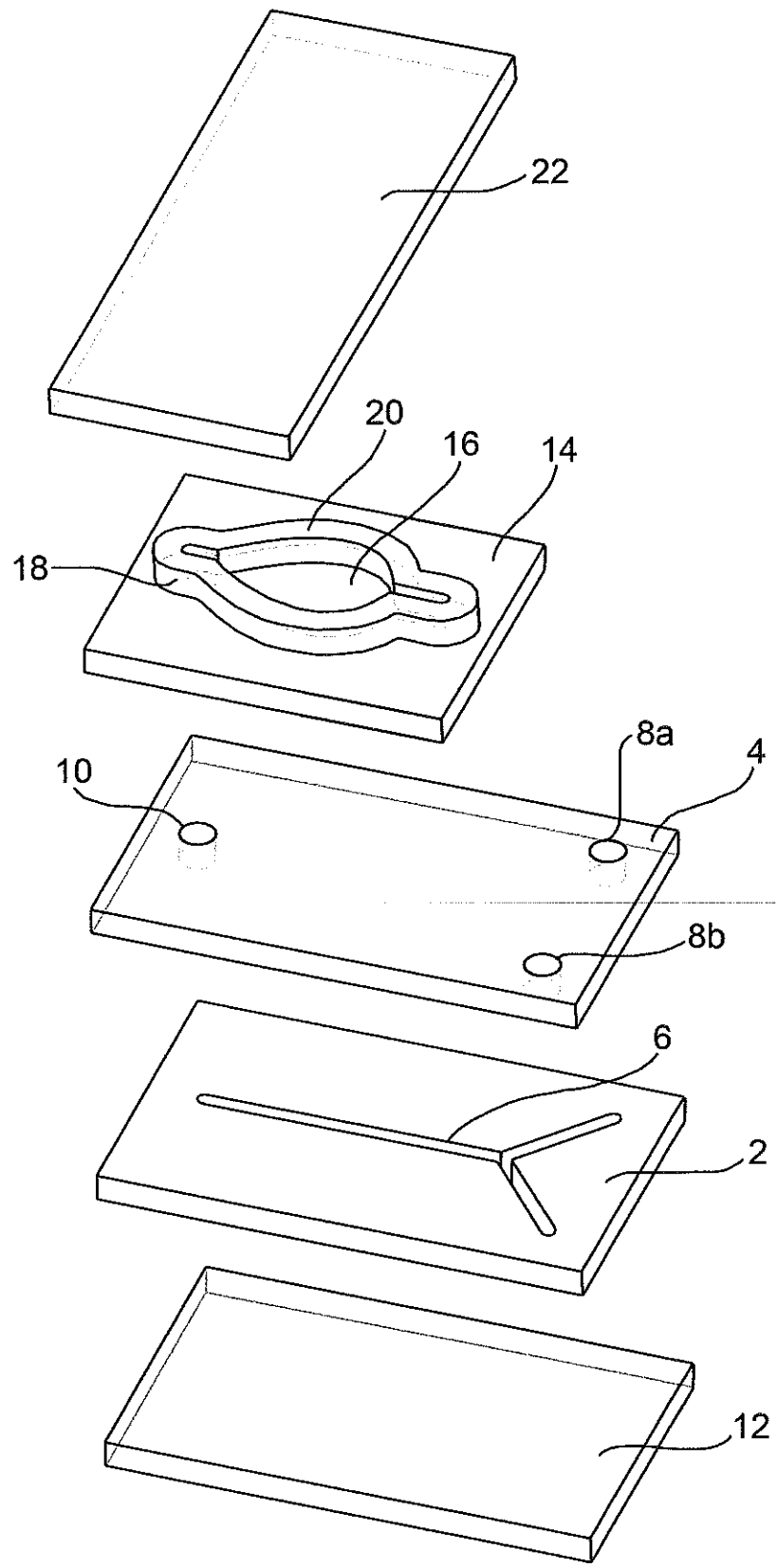


FIG.1

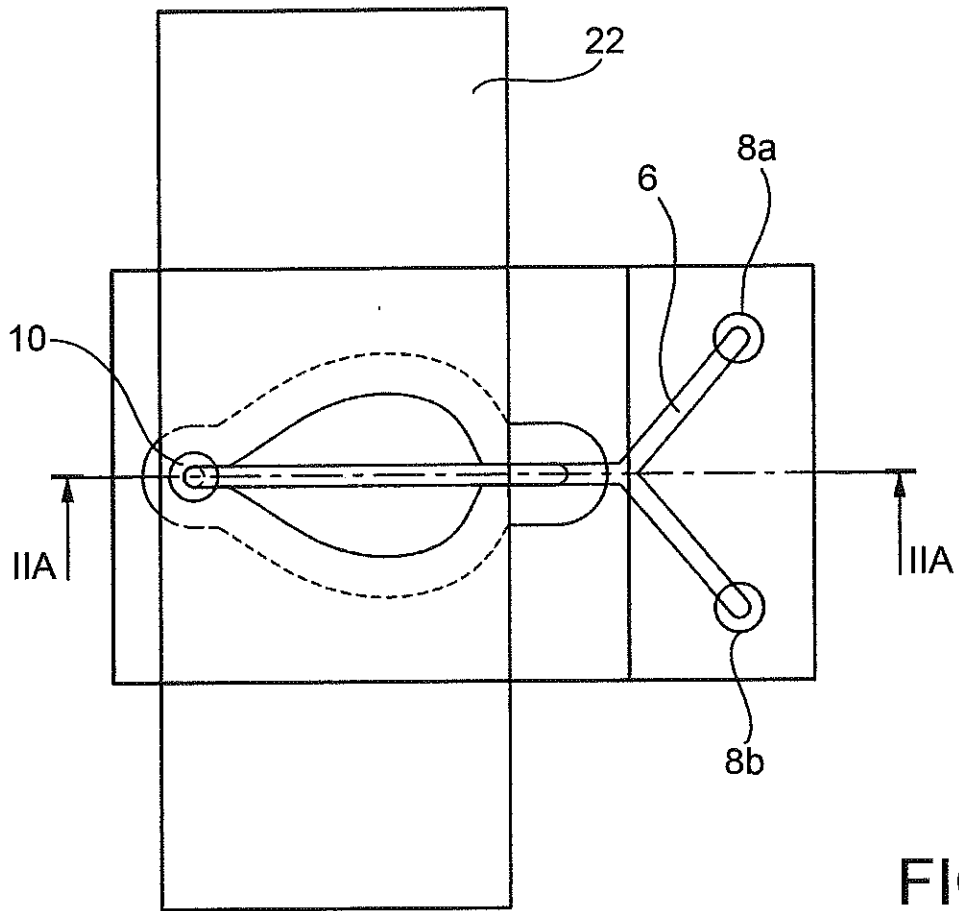


FIG. 2

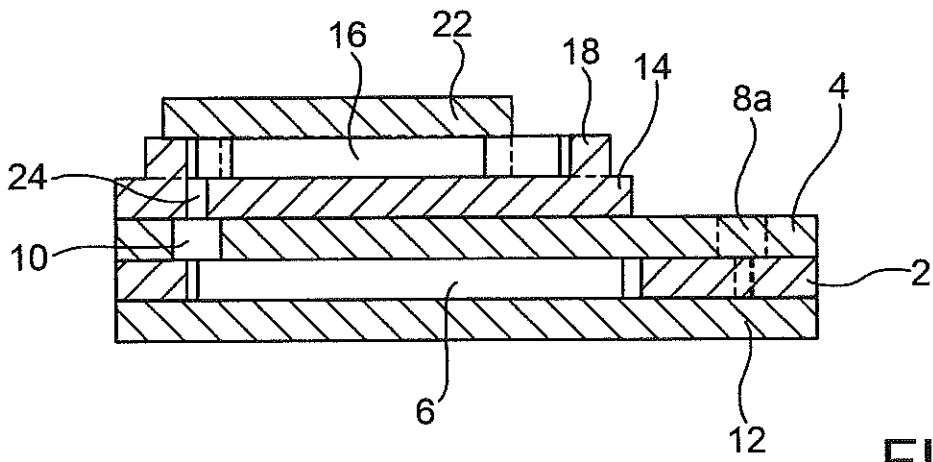
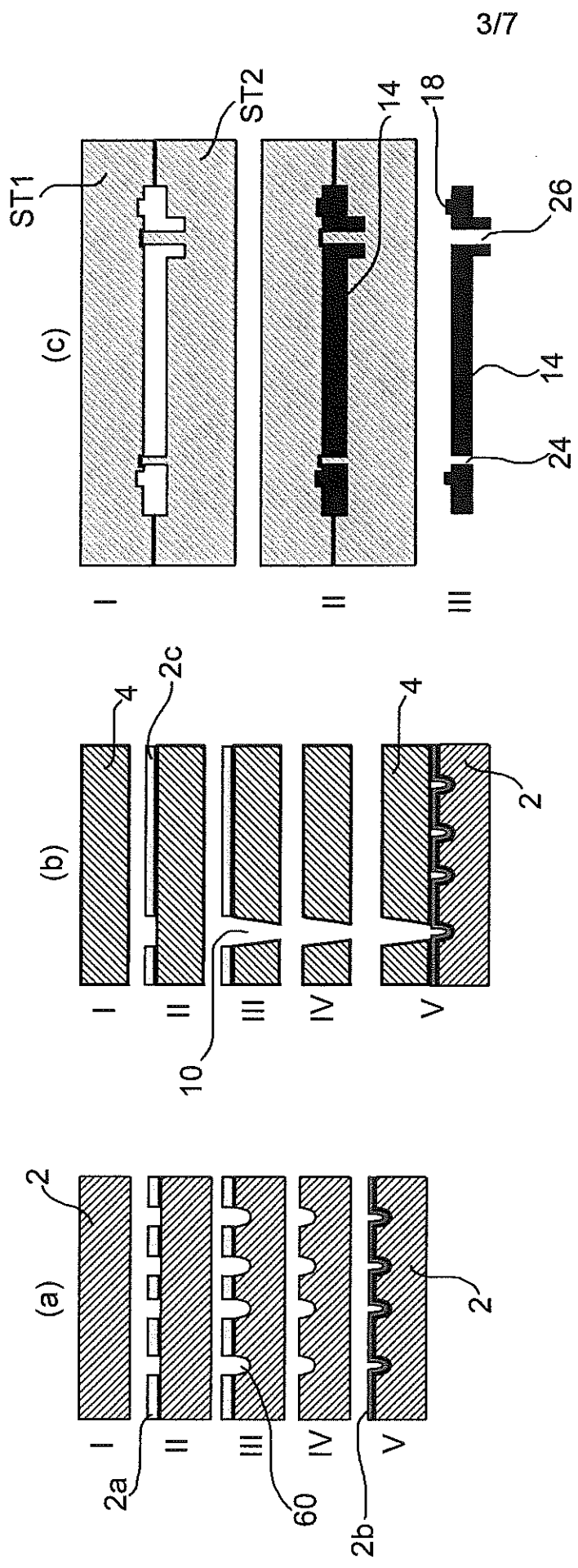


FIG. 2A



3/7








-  Silicio
-  Fotorisist
-  Ossido di silicio
-  Pyrex
-  Vetrino con micromatrice
-  PDMS
-  PMMA

FIG.3

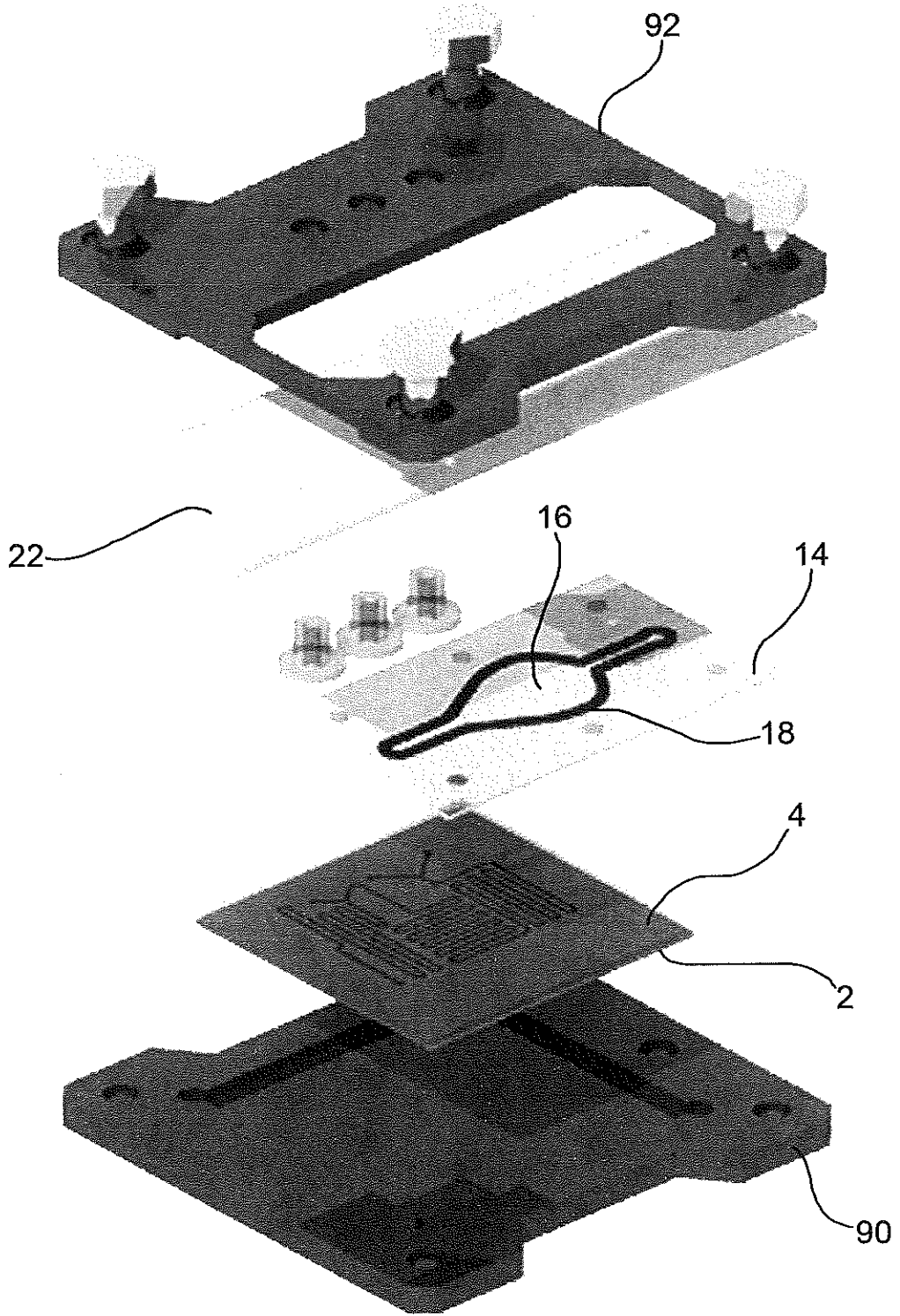


FIG.4

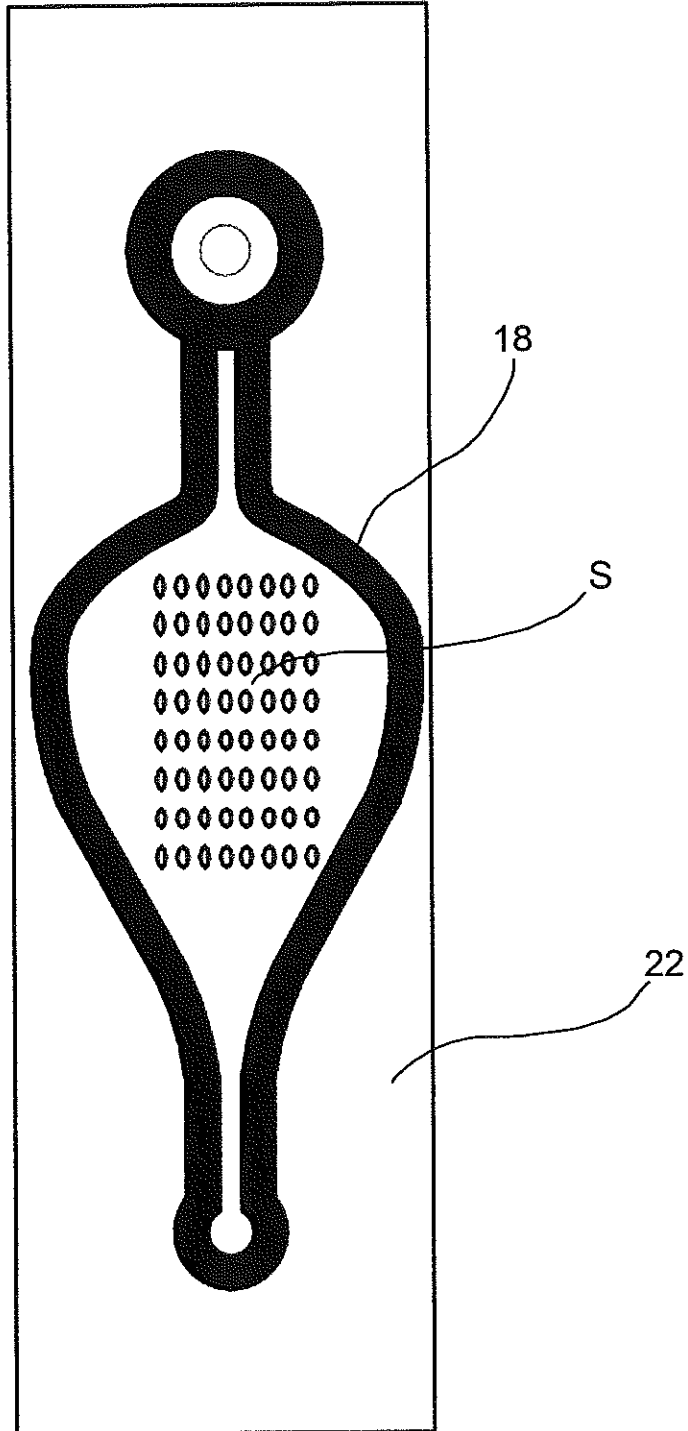


FIG.5

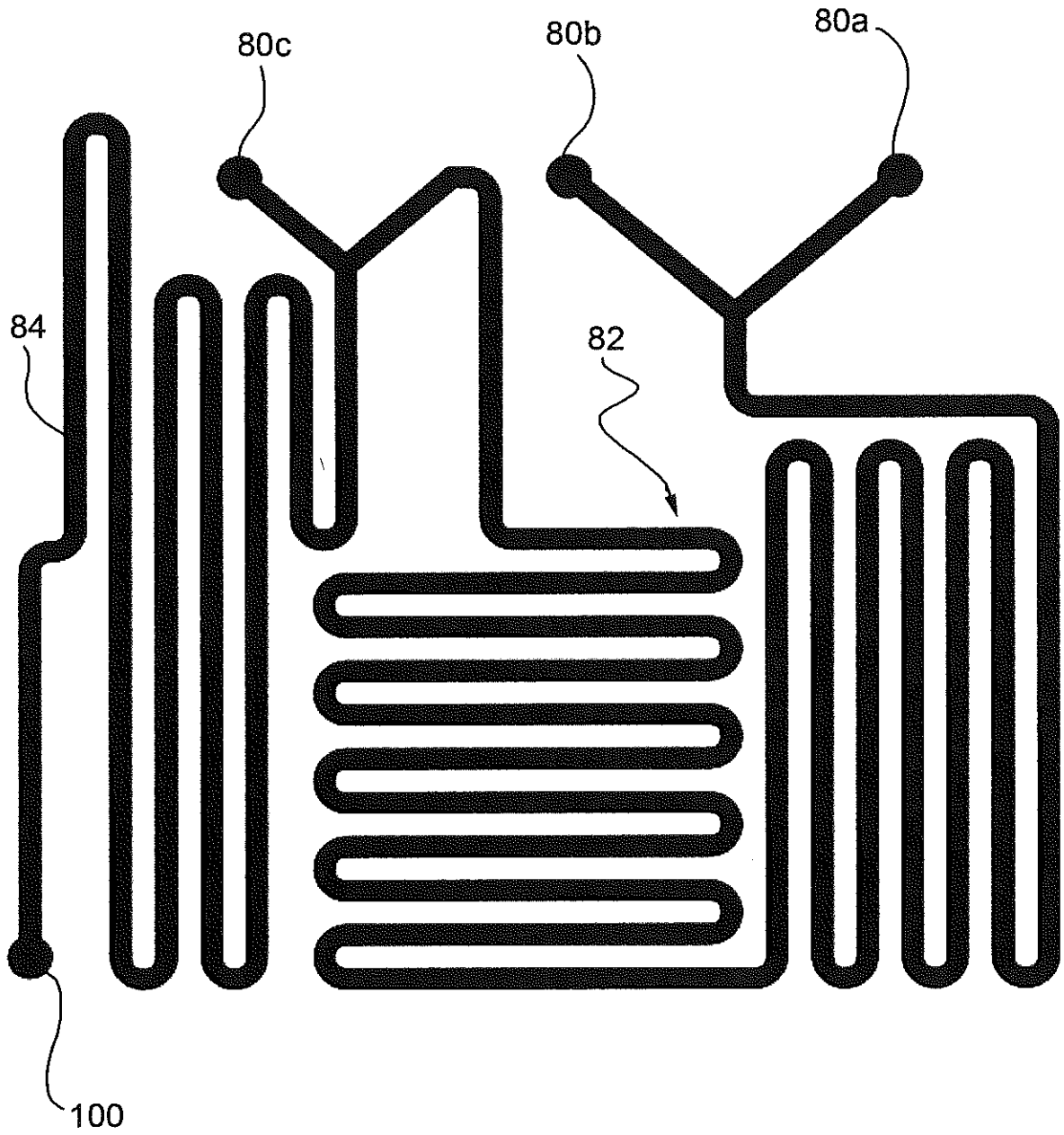


FIG.6

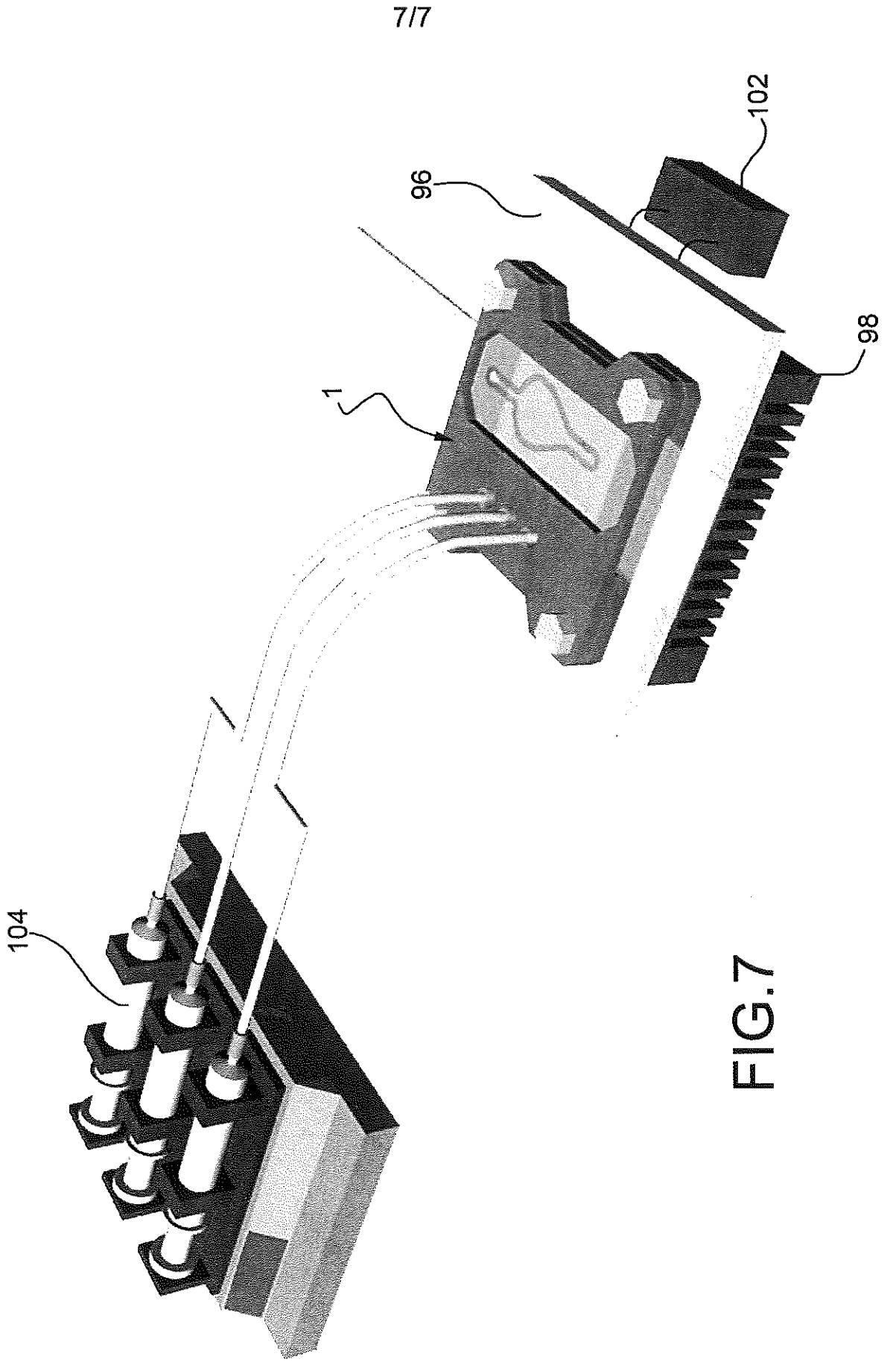


FIG.7

CLAIMS

1. A microfluidic device for carrying out a genomic protocol, comprising at least a first (2, 12) and a second (4) substrate, jointly defining a microfluidic circuit (6) with at least an inlet (8a, 8b) communicating with said circuit and at least an outlet (10) communicating with said circuit, characterised in that it comprises at least a third substrate (14) arranged in an overlapping relationship with said first and second substrate and a fourth substrate (22), jointly defining with said third substrate an end reaction chamber (16) which communicates with said microfluidic circuit (6) through said outlet (10), wherein said fourth substrate is associated in an overlapping relationship with said third substrate in a removable manner and has a surface facing said reaction chamber (16) wherein one or more sensors or detection probes are fixed.

2. A microfluidic device according to claim 1, characterised in that said first and second substrate are connected with each other in a non-reversible manner.

3. A microfluidic device according to claims 1 or 2, characterised in that the third substrate (14)

comprises an annular rib (18), integral with said third substrate, defining said reaction chamber (16), the contact area between said third (14) and fourth (22) substrate being limited to the surface of said annular rib (18) which defines said reaction chamber.

4. A microfluidic device according to any of claims 1 to 3, characterised in that said third substrate comprises an outlet (26), communicating with said reaction chamber (16).

5. A microfluidic device according to any of claims 1 to 4, characterised in that said third substrate (14) which defines said reaction chamber is of a polymeric elastomeric material, particularly polydimethylsiloxane.

6. A microfluidic device according to any of the preceding claims, comprising mechanical fastening means which can be disengaged, adapted to sealingly bind said third and fourth substrate to said first and second substrate.

7. A microfluidic device according to any of the preceding claims, characterised in that said fourth substrate comprises, on its surface facing said reaction chamber (16), a plurality of probes (6) which are arranged in a matrix.

8. A microfluidic device according to any of the preceding claims, characterised in that said microfluidic circuit comprises at least a first (80a) inlet and at least a second inlet (80b) for introducing reagents into said circuit, at least a serpentine-shaped mixing region (82), at least a third inlet (80c) for introducing a reagent in the microfluidic circuit downstream of said mixing region, at least a second mixing region (84) downstream of said third inlet (80c) and at least an outlet (100) allowing fluid communication with said reaction chamber.

9. A microfluidic device according to any of the preceding claims, comprising associated heating means (96, 98) and associated pumping means (104) for feeding a sample and/or reagents to said microfluidic circuit.