



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 134 481**

⑤① Int. Cl.⁶: G01N 33/543
G01N 33/68

⑫

TRADUCCION DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧⑥ Número de solicitud europea: **95923921.1**
⑧⑥ Fecha de presentación : **16.06.95**
⑧⑦ Número de publicación de la solicitud: **0 804 731**
⑧⑦ Fecha de publicación de la solicitud: **05.11.97**

⑤④ Título: **Método y aparato para producir microconjuntos de muestras biológicas.**

③⑩ Prioridad: **17.06.94 US 261388**
07.06.95 US 477809

④⑤ Fecha de la publicación de la mención BOPI:
01.10.99

④⑤ Fecha de la publicación del folleto de patente:
01.10.99

⑦③ Titular/es:
**THE BOARD OF TRUSTEES OF THE
LELAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY
Stanford, California 94305, US**

⑦② Inventor/es: **Shalon, Tidhar Dari y
Brown, Patrick O.**

⑦④ Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (artº 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCION

Método y aparato para producir microconjuntos de muestras biológicas.

Campo del invento

Este invento se refiere a un método y a un aparato para producir microconjuntos de muestras biológicas para análisis de exploración a gran escala, tales como conjuntos de muestras de ADN que se han de utilizar en análisis de hibridación de ADN para aplicaciones de investigación genética y de diagnóstico.

Referencias

Abouzied y colaboradores, *Journal of AOAC International* **77**(2):495-500 (1994).

Bohlander y colaboradores, *Genomics* **13**:1.322-1.324 (1992).

Drmanac y colaboradores, *Science* **260**:1.649-1.652 (1993).

Fodor y colaboradores, *Science* **251**:767-773 (1991).

Khrapko y colaboradores, *DNA Sequence* **1**: 375-388 (1991).

Kuriyama y colaboradores, *An Isfet Biosensor, Applied Biosensors* (Donald Wise, coordinador de edición), Butterworths, páginas 93-114 (1989).

Lehrach y colaboradores, *Hybridization Fingerprinting in Genome Mapping and Sequencing, Genome Analysis, Volumen 1* (Davies y Tilgham, coordinadores de edición), Cold Spring Harbor Press, páginas 39-81 (1990).

Maniatis y colaboradores, *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press (1989).

Nelson y colaboradores, *Nature Genetics* **4**:11-18 (1993).

Pirrung y colaboradores, Patente de los EE.UU. 5.143.854 (1992).

Riles y colaboradores, *Genetics* **134**:81-150 (1993).

Schena M. y colaboradores, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **89**:3.894-3.898 (1992).

Southern y colaboradores, *Genomics* **13**:1.008-1.017 (1992).

Antecedentes del invento

Actualmente se encuentran disponibles una diversidad de métodos para producir conjuntos de macromoléculas biológicas, tales como conjuntos de moléculas de ácidos nucleicos o proteínas. Un método para producir conjuntos ordenados de ADN sobre una membrana porosa es un enfoque de "borrones de puntos = *dot blot*". En este método, un múltiple distribuidor en vacío transfiere una pluralidad, p. ej. de 96 muestras acuosas de ADN desde pocillos con un diámetro de 3 milímetros a una membrana porosa. Una variante corriente de este procedimiento es un método de "borrones de rendijas = *slot-blot*", en el que los pocillos tienen unas formas ovaladas muy alargadas.

El ADN es inmovilizado sobre la membrana porosa cociendo la membrana o exponiéndola a radiación de UV. Éste es un procedimiento manual que resulta práctico para producir una agrupación de una sola vez y está usualmente limitado a 96 muestras por conjunto. Por lo tanto, los procedimientos de "borrones de puntos" son

inadecuados para aplicaciones en las cuales han de determinarse muchos millares de muestras.

Una técnica más eficaz, empleada para producir conjuntos ordenados de fragmentos genómicos, utiliza un conjunto de alfileres sumergidos en los pocillos, p. ej. en los 96 pocillos de una placa de microtitulación, para transferir un conjunto de muestras a un sustrato, tal como una membrana porosa. Un conjunto incluye alfileres que están diseñadas para motear una membrana de una manera escalonada, para crear un conjunto de 9.216 motas en una zona de 22 x 22 cm (Lehrach, y colaboradores, 1990). Una limitación que se presenta con este enfoque consiste en que el volumen de ADN moteado en cada pixel (elemento de imagen) de cada conjunto es muy variable. Además, el número de conjuntos que se pueden producir con cada inmersión es usualmente bastante pequeño.

Un método alternativo para crear conjuntos ordenados de secuencias de ácidos nucleicos ha sido descrito por Pirrung y colaboradores (1992), y también por Fodor y colaboradores (1991). El método implica sintetizar diferentes secuencias de ácidos nucleicos en diferentes regiones discretas de un soporte. Este método emplea complicados esquemas de síntesis, y está limitado generalmente a una muestra de un ácido nucleico relativamente corto, p. ej. menor que 20 bases. Un método relacionado ha sido descrito por Southern y colaboradores (1992).

Khrapko y colaboradores (1991) describen un método para producir una matriz de oligonucleótido moteando (aplicando en motas) un ADN sobre una delgada capa de poliacrilamida. El moteado (la aplicación de motas) se hace manualmente con una micropipeta.

Ninguno de los métodos o dispositivos descritos en la técnica anterior está diseñado para la producción a gran escala de microconjuntos, caracterizados por (i) un gran número de regiones de análisis dimensionadas en micrómetros, separadas por una distancia de 50-200 micrómetros o menos, y (ii) una cantidad bien definida, típicamente en el margen de los picomoles, de un analito asociado con cada región del conjunto.

Además, la tecnología actual se dirige a la realización de tales análisis de una sola vez para un único conjunto de moléculas de ADN. Por ejemplo, el método más corriente de realizar hibridaciones de ADN en conjuntos moteados sobre una membrana porosa implica cerrar herméticamente la membrana en una bolsa de material plástico (Maniatis y colaboradores, 1989) o un cilindro de vidrio giratorio (Robbins Scientific) estando la sonda de hibridación marcada dentro de la cámara herméticamente cerrada. Para conjuntos producidos sobre superficies no porosas, tal como un portaobjetos de microscopio, cada conjunto es incubado con la sonda de hibridación marcada cerrada herméticamente bajo un cubreobjetos. Estas técnicas requieren una cámara herméticamente cerrada por separado para cada conjunto, lo cual hace que la exploración y la manipulación de muchos de estos conjuntos resulten inconvenientes y consuman mucho tiempo.

Abouzied y colaboradores (1994) describen un método para imprimir líneas horizontales de

anticuerpos sobre una membrana de nitrocelulosa y separar regiones de la membrana con franjas verticales de un material hidrófobo. Luego, cada franja vertical se hace reaccionar con un antígeno diferente y se detecta la reacción entre el anticuerpo inmovilizado y un antígeno utilizando una técnica colorimétrica ELISA normalizada. La técnica de Abouzied hace posible explorar muchos conjuntos unidimensionales de modo simultáneo sobre una única lámina de nitrocelulosa. Abouzied hace a la nitrocelulosa algo hidrófoba utilizando una línea trazada con el estilete PAP Pen (Research Products International). Sin embargo, Abouzied no describe ninguna tecnología que sea capaz de obturar por completo los poros de la nitrocelulosa. Los poros de la nitrocelulosa están todavía físicamente abiertos y de este modo los reactivos para el análisis se pueden derramar a través de la barrera hidrófoba durante prolongadas incubaciones a altas temperaturas o en presencia de detergentes, lo cual hace que la técnica de Abouzied sea inaceptable para análisis de hibridación de ADN.

Existen membranas porosas con diseños impresos de regiones hidrófilas/hidrófobas para aplicaciones tales como conjuntos ordenados de colonias de bacterias. La entidad QA Life Sciences (San Diego CA) produce tal membrana con un diseño de rejilla impreso sobre ella. Sin embargo, esta membrana tiene la misma desventaja que la técnica de Abouzied, puesto los que los reactivos pueden todavía circular entre los conjuntos enrejillados haciéndolos inútiles para análisis de hibridación de ADN por separado.

La entidad Pall Corporation produce una placa de 96 pocillos con un filtro poroso termosellado al fondo de la placa. Estas placas son capaces de contener diferentes reactivos en cada pocillo sin contaminación cruzada entre ellos. Sin embargo, cada pocillo está destinado a contener solamente un elemento diana mientras que el invento aquí descrito produce un microconjunto de muchas biomoléculas en cada región subdividida del soporte sólido. Además, las placas de 96 pocillos tienen un espesor de al menos 1 cm e impiden el uso del dispositivo para muchos formatos de detección colorimétricos, fluorescentes y radiactivos, que requieren que la membrana se coloque de modo plano contra la superficie de detección. El invento aquí descrito no requiere ningún tratamiento adicional después de la operación de análisis, puesto que los elementos de barreras son poco profundos y no interfieren con la operación de detección, aumentando con ello en gran manera la utilidad.

La entidad Hyseq Corporation ha descrito un método producir un "conjunto de conjuntos" sobre un soporte sólido no poroso para utilizarlo en su secuenciación por la técnica de hibridación. El método descrito por Hyseq implica modificar las condiciones químicas del material de soporte sólido para formar un diseño de rejilla hidrófoba en el que cada región subdividida contiene un microconjunto de biomoléculas. El diseño hidrófobo plano de Hyseq no utiliza el bloqueo físico como un medio adicional de impedir la contaminación cruzada.

Sumario del invento

El invento incluye, en un aspecto, un método de formar un microconjunto de regiones para análisis de analitos sobre un soporte sólido, en que cada región en el conjunto tiene una cantidad conocida de un reactivo seleccionado, que es específico para un analito. El método implica primeramente cargar una solución de un reactivo seleccionado, específico para un analito, en un dispositivo distribuidor de reactivos, que tiene un canal capilar alargado (i) formado por miembros alargados, de la misma extensión, distanciados entre sí, (ii) destinado a retener una cierta cantidad de la solución de reactivo y (iii) que tiene una región de punta en la que una solución acuosa existente en el canal forma un menisco. El canal está formado preferiblemente por un par de elementos estrechados cónicamente, separados entre sí.

La punta del dispositivo distribuidor es golpeada ligeramente contra un soporte sólido en una posición definida sobre la superficie del soporte con un impulso que es eficaz para romper el menisco en el canal capilar y depositar un volumen seleccionado de solución sobre la superficie, preferiblemente un volumen seleccionado en el margen de 0,01 a 100 nl. Las dos operaciones se repiten hasta que se forme el conjunto deseado.

El método se puede llevar a la práctica para formar una pluralidad de tales conjuntos, en el que la operación de deposición de soluciones es aplicada a una posición seleccionada sobre cada uno de una pluralidad de soportes sólidos en cada ciclo de repetición.

El dispositivo distribuidor puede ser cargado con una nueva solución, por las operaciones de (i) sumergir el canal capilar del dispositivo en una solución de lavado, (ii) eliminar la solución de lavado arrastrada dentro del canal capilar, y (iii) sumergir el canal capilar en la nueva solución de reactivo.

También se incluye en el invento un aparato automático para formar un microconjunto de regiones para análisis de analitos sobre una pluralidad de soportes sólidos, en el que cada región en el conjunto tiene una cantidad conocida de un reactivo seleccionado, específico para un analito. El aparato tiene una montura para retener, en posiciones conocidas, una pluralidad de soportes planos y un dispositivo distribuidor de reactivos del tipo antes descrito, siendo el canal capilar de costados abiertos.

El aparato incluye además una estructura de colocación para colocar el dispositivo distribuidor en una posición seleccionada del conjunto con respecto a un soporte en dicha montura, y una estructura distribuidora para mover el dispositivo distribuidor a aplicación de golpeo ligero contra un soporte con un impulso seleccionado que es eficaz para depositar un volumen seleccionado sobre el soporte, p. ej. un volumen seleccionado en el margen de volúmenes de 0,01 a 100 nl.

Las estructuras de colocación y distribución son controladas por una unidad de control existente en el aparato. La unidad funciona para (i) colocar el dispositivo distribuidor en un puesto de carga, (ii) mover el canal capilar existente en el

dispositivo dentro de un reactivo seleccionado en el puesto de carga, para cargar el dispositivo distribuidor con el reactivo, y (iii) distribuir el reactivo en una posición definida del conjunto sobre cada uno de los soportes de dicha montura. La unidad puede trabajar adicionalmente, al final de un ciclo de distribución, para lavar el dispositivo de distribución (i) colocando el dispositivo distribuidor en un puesto de lavado, (ii) moviendo el canal capilar existente en el dispositivo dentro de un fluido de lavado, para cargar el dispositivo distribuidor con el fluido, y (iii) eliminando el fluido de lavado antes de cargar el dispositivo distribuidor con un reactivo seleccionado de nueva aportación.

El dispositivo distribuidor existente en el aparato puede ser uno cualquiera entre una pluralidad de tales dispositivos que están soportados sobre el brazo para distribuir diferentes reactivos de análisis de analitos en posiciones separadas seleccionadas del conjunto.

En otro aspecto, el invento incluye un substrato con una superficie que tiene un microconjunto de al menos 103 biopolímeros polinucleotídicos distintos en un área de superficie menor que aproximadamente 1 cm². Cada biopolímero distinto (i) está dispuesto en una posición definida, por separado, en dicho conjunto, (ii) tiene una longitud de al menos 50 subunidades, y (iii) está presente en una cantidad definida entre aproximadamente 0,1 femtomoles y 100 nanomoles.

En una realización, la superficie es una superficie de portaobjetos de vidrio revestida con un polímero policatiónico, tal como polilisina, y los biopolímeros son polinucleótidos con una longitud de al menos 50 subunidades. En otra realización, este substrato tiene un respaldo impermeable al agua, una película permeable al agua formada sobre el respaldo, y una rejilla formada sobre la película. La rejilla se compone de elementos de rejilla intersecantes, impermeables al agua, que se extienden desde dicho respaldo hasta posiciones resaltadas sobre la superficie de dicha película, y que subdividen a la película en una pluralidad de celdillas impermeables al agua. Un conjunto de biopolímeros es formado dentro de cada pocillo.

Este substrato está previsto para utilizarse en detectar la unión de polinucleótidos marcados a uno o más de una pluralidad de polinucleótidos inmovilizados de diferentes secuencias. Este substrato incluye, en un aspecto, un soporte de vidrio, un revestimiento de un polímero policatiónico, tal como polilisina, sobre dicha superficie de soporte, y un conjunto de polinucleótidos distintos unidos electrostáticamente por enlaces no covalentes a dicho revestimiento, en que cada uno de los biopolímeros distintos está dispuesto en una posición definida separada en un conjunto superficial de polinucleótidos.

En otro aspecto, este substrato incluye un respaldo impermeable al agua, una película permeable al agua formada sobre el respaldo, y una rejilla formada sobre la película, en que la rejilla se compone de elementos de rejilla intersecantes, impermeables al agua, que se extienden desde el respaldo a posiciones resaltadas sobre la superfi-

cie de la película, formando una pluralidad de celdillas. Un conjunto de biopolímeros es formado dentro de cada celdilla.

También forma parte del invento un método para detectar la expresión diferencial de cada uno de una pluralidad de genes de un primer tipo de células, con respecto a la expresión de los mismos genes en un segundo tipo de células. Para llevar a la práctica el método, primeramente se producen ADNc's marcados fluorescentemente a partir de ARNm's aislados a partir de los dos tipos de células, en que los ADNc's procedentes de los tipos primero y segundo de células son marcados con primeros y segundos reporteros fluorescentes diferentes.

Una mezcla de los ADNc's marcados procedentes de los dos tipos de células se añade a un conjunto de polinucleótidos con una longitud mayor que 50 subunidades, que representan a una pluralidad de genes conocidos, derivados de los dos tipos de células, en condiciones tales que dan como resultado la hibridación de los ADNc's con polinucleótidos de secuencias complementarias en el conjunto. Luego el conjunto es examinado por fluorescencia en condiciones de excitación de la fluorescencia, en que (i) los polinucleótidos en el conjunto, que están hibridados predominantemente con ADNc's derivados de uno de los tipos primero y segundo de células dan un color de emisión de fluorescencia distinto, primero o segundo, respectivamente, y (ii) los polinucleótidos en el conjunto que están hibridados con números sustancialmente iguales de ADNc's derivados de los tipos primero y segundo de células, dan un color de emisión de fluorescencia combinado distinto, respectivamente. La expresión relativa de genes conocidos de los dos tipos de células se puede determinar entonces por el color de emisión de fluorescencia observado de cada mota.

Estos objetos y particularidades del invento resultarán evidentes de un modo más completo cuando la siguiente descripción detallada del invento se lea en conjunción con las figuras anejas.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es una vista lateral de un dispositivo distribuidor de reactivos que tiene una cabeza distribuidora de capilar abierto, estructurada para utilizarse en una realización del invento;

las Figuras 2A-2C ilustran operaciones en el suministro de un glóbulo de volumen preestablecido sobre una superficie hidrófoba empleando la cabeza distribuidora de la Figura 1, de acuerdo con una realización del método del invento;

la Figura 3 muestra una porción de un conjunto bidimensional de regiones para análisis de analitos, estructuradas de acuerdo con el método del invento;

la Figura 4 es una vista plana que muestra componentes de un aparato automático para formar conjuntos de acuerdo con el invento;

la Figura 5 muestra una imagen fluorescente de un conjunto real de 20 x 20 de 400 muestras de ADN marcadas fluorescentemente, que están inmovilizadas sobre un portaobjetos revestido con poli-l-lisina, en que el área total cubierta por el conjunto de 400 elementos es de 16 milímetros cuadrados;

la Figura 6 es una imagen fluorescente de un

microconjunto de 1,8 cm x 1,8 cm que contiene clones lambda con insertos de levadura, surgiendo la señal fluorescente de la hibridación con el conjunto con aproximadamente la mitad del genoma de levadura marcada con un fluoróforo verde y con la otra mitad marcada con un fluoróforo rojo;

la Figura 7 muestra la traducción de la imagen de hibridación de la Figura 6 en un cariotipo del genoma de levadura, en el que los elementos del microconjunto de la Figura 6 contienen secuencias de ADN de levadura que previamente han sido cartografiadas físicamente en el genoma de levadura;

la Figura 8 muestra una imagen fluorescente de un microconjunto de 0,5 cm x 0,5 cm de 24 clones de ADNc, en el que el microconjunto se había hibridado simultáneamente con el ADNc total procedente de la planta *Arabidopsis* de tipo salvaje, marcada con un fluoróforo verde, y el ADNc total procedente de una planta *Arabidopsis* transgénica, marcada con un fluoróforo rojo, y la flecha apunta hacia el clon de ADNc que representa al gen introducido en la planta *Arabidopsis* transgénica;

la Figura 9 muestra una vista en planta de un sustrato que tiene un conjunto de celdillas formadas por elementos de barrera en la forma de una rejilla;

la Figura 10 muestra una vista en planta ampliada de una de las celdillas en el sustrato de la Figura 9, que muestra un conjunto de regiones de polinucleótidos en la celdilla;

la Figura 11 es una vista en sección ampliada del sustrato en la Figura 9, tomada a lo largo de una línea de sección en esa Figura; y

la Figura 12 es una imagen explorada de un soporte sólido de nitrocelulosa de 3 cm x 3 cm que contiene cuatro conjuntos idénticos de clones de M13 en cada uno de los cuatro cuadrantes, en que cada cuadrante se había hibridado simultáneamente con un diferente oligonucleótido utilizando un método de hibridación de caras abiertas.

Descripción detallada del invento

I. Definiciones

A menos que se indique otra cosa distinta, los términos seguidamente definidos tienen los siguientes significados:

“Ligando” se refiere a un miembro de un par de unión entre un ligando y un anti-ligando. El ligando puede ser, por ejemplo, una de las cadenas de ácido nucleico en un par de unión duplex de ácido nucleico hibridado, complementario; una molécula efectora en un par de unión entre una efectora y una receptor; o un antígeno en un par de unión entre un antígeno y un anticuerpo o entre un antígeno y un fragmento de anticuerpo.

“Anti-ligando” se refiere al miembro opuesto de un par de unión entre un ligando y un anti-ligando. El anti-ligando puede ser la otra de las cadenas de ácido nucleico en un par de unión duplex de ácido nucleico hibridado, complementario; la molécula receptora en un par de unión entre una efectora y una receptora; o una molécula de anticuerpo o fragmento de anticuerpo en un par de unión entre un antígeno y un anticuerpo o entre un antígeno y un fragmento de anticuerpo, respectivamente.

“Analito” o “molécula de analito” se refiere a una molécula, típicamente una macromolécula, tal como un polinucleótido o polipéptido, cuya presencia, cantidad y/o identidad se tengan que determinar. El analito es un miembro de un par de unión entre un ligando y un anti-ligando.

“Reactivo de análisis específico para un analito” se refiere a una molécula eficaz para unirse específicamente a una molécula de un analito. El reactivo es el miembro opuesto de un par de unión entre un ligando y un anti-ligando.

Un “conjunto de regiones sobre un soporte sólido” es un conjunto lineal o bidimensional de regiones, preferiblemente discretas, cada una de las cuales tiene un área finita, formadas sobre la superficie de un soporte sólido.

Un “microconjunto” es un conjunto de regiones que tiene una densidad de regiones discretas de al menos aproximadamente 100/cm² y preferiblemente de al menos aproximadamente 1.000/cm². Las regiones existentes en un microconjunto tienen unas dimensiones típicas, p. ej. unos diámetros, en el margen comprendido entre aproximadamente 10 y 250 μm, y están separadas de otras regiones en el conjunto por aproximadamente la misma distancia.

Una superficie de soporte es “hidrófoba” si una gotita de un medio acuoso, aplicada a la superficie, no se desparrama sustancialmente más allá del tamaño del área de la gotita aplicada. Esto quiere decir que la superficie actúa para evitar el desparramamiento de la gotita aplicada a la superficie por interacción hidrófoba con la gotita.

Un “menisco” significa una superficie cóncava o convexa que se forma sobre el fondo de un líquido en un canal como resultado de la tensión superficial del líquido.

“Biopolímeros distintos”, tal como se aplican a los biopolímeros que forman un microconjunto, significan un miembro del conjunto que es distinto de otros miembros del conjunto sobre la base de una diferente secuencia de biopolímero, y/o de diferentes concentraciones de los mismos o distintos biopolímeros y/o diferentes mezclas de biopolímeros distintos o en diferente concentración. Por lo tanto, un conjunto de “polinucleótidos distintos” significa un conjunto que contiene, como sus miembros, (i) distintos polinucleótidos, que pueden tener una cantidad definida de cada miembro, (ii) diferentes concentraciones graduadas de polinucleótidos de secuencia establecida y/o (iii) mezclas de diferentes composiciones de dos o más polinucleótidos distintos.

“Tipo de células” significa una célula procedente de una fuente dada, p. ej. un tejido, un órgano, una célula en un estado dado de diferenciación, o una célula asociada con una patología o constitución genética establecida.

II. Método de formación de microconjuntos

Esta sección describe un método para formar un microconjunto de regiones para análisis de analitos sobre un soporte o sustrato sólido, en que cada región en el conjunto tiene una cantidad conocida de un reactivo seleccionado, específico para un analito.

La Figura 1 ilustra, en una vista parcialmente esquemática, un dispositivo 10 distribuidor de reactivos, útil para poner en práctica el método.

El dispositivo incluye generalmente un distribuidor 12 de reactivos, que tiene un canal capilar abierto alargado 14 destinado a retener una cantidad de la solución de reactivo, como se indica por 16, tal como se describirá más adelante. El canal capilar es formado por un par de miembros alargados 12a, 12b de la misma extensión, separados entre sí, que se estrechan cónicamente uno hacia otro y convergen en una punta o región de punta 18 junto al extremo inferior del canal. De un modo más general, el canal abierto está formado por al menos dos miembros alargados, separados entre sí, destinados a retener una cierta cantidad de soluciones de reactivos y que tienen una región de punta junto a la que la solución acuosa existente en el canal forma un menisco, tal como el menisco cóncavo ilustrado por 20 en la Figura 2A. Las ventajas de la estructura de canal abierto del distribuidor se discuten seguidamente.

Continuando la referencia a la Figura 1, el dispositivo distribuidor incluye también una estructura para mover el distribuidor rápidamente acercándolo a, y alejándolo de, una superficie de soporte, para efectuar la deposición de una cantidad conocida de una solución existente en el distribuidor sobre un soporte, como se describirá más adelante al hacer referencia a las Figuras 2A-2C. En la realización que se muestra, esta estructura incluye un solenoide 22 que puede ser activado para impulsar rápidamente hacia abajo a un pistón 24 de solenoide, luego liberar el pistón, p. ej. bajo la influencia de un resorte, a una posición resaltada normal, como se muestra. El distribuidor está soportado sobre el pistón por un miembro de conexión 26, como se muestra. La estructura en movimiento que se acaba de describir es citada aquí también como "medios distribuidores para mover el distribuidor a aplicación con un soporte sólido, a fin de distribuir un volumen conocido de fluido sobre el soporte".

El dispositivo distribuidor que se acaba de describir está soportado por un brazo 28 que puede ser movido o bien linealmente o en un plano x-y para colocar el distribuidor en una posición seleccionada de deposición, como se describirá.

Las Figuras 2A-2C ilustran el método de depositar una cantidad conocida de una solución de reactivo en el distribuidor que se acaba de describir sobre la superficie de un soporte sólido, tal como el soporte indicado por 30. El soporte es un soporte de material polímero, vidrio u otro material sólido que tiene una superficie indicada por 31.

En una realización general, la superficie es una superficie relativamente hidrófila, es decir humectable, tal como una superficie que tiene grupos cargados nativos, combinados o enlazados covalentemente. Una de tales superficies que se describe seguidamente es una superficie de vidrio que tiene una capa absorbida de un polímero policationico, tal como poli-l-lisina.

En otra realización, la superficie tiene, o está formada para tener, un carácter relativamente hidrófobo, es decir una que haga que un medio acuoso depositado sobre la superficie se conglomere en forma de un glóbulo. Una diversidad de conocidos polímeros hidrófobos, tales como po-

lietireno, polipropileno, o polietileno, tienen deseadas propiedades hidrófobas, como las tienen el vidrio y una diversidad de películas lubricantes o hidrófobas de otro tipo, que se pueden aplicar a la superficie de soporte.

Inicialmente, el distribuidor es cargado con una solución seleccionada de un reactivo específico para un analito, por ejemplo sumergiendo la punta del distribuidor, después de haberla lavado, en una solución del reactivo, y dejándola que llene por flujo capilar el interior del canal del distribuidor. Luego el distribuidor es movido hasta una posición seleccionada con respecto a una superficie del soporte, colocando la punta del distribuidor directamente por encima de la posición de la superficie del soporte, junto a la que se ha de depositar el reactivo. Este movimiento tiene lugar con la punta del distribuidor en su posición alzada, como se observa en la Figura 1, en que la punta está típicamente al menos en alrededor de 1-5 mm por encima de la superficie del sustrato.

Estando el distribuidor así colocado, seguidamente se activa el solenoide 22 para dar lugar a que la punta del distribuidor se mueva rápidamente acercándose a, y alejándose de, la superficie del sustrato, haciendo un contacto provisional con la superficie, en realidad, golpeando ligeramente con la punta del distribuidor contra la superficie de soporte. El movimiento de golpeo ligero de la punta contra la superficie actúa rompiendo el menisco de líquido en el canal de la punta, poniendo al líquido existente en la punta en contacto con la superficie de soporte. Esto, a su vez, produce una circulación del líquido dentro del espacio capilar entre la punta y la superficie, actuando para arrastrar líquido fuera del canal del distribuidor, como se ve en la Figura 2B.

La Figura 2C muestra la circulación del fluido desde la punta sobre la superficie del soporte, que en este caso es una superficie hidrófoba. La figura ilustra que el líquido continua circulando desde el distribuidor hacia sobre la superficie del soporte hasta que se forme un glóbulo 32 de líquido. Con un tamaño dado, es decir con un volumen dado, del glóbulo, la tendencia del líquido a fluir sobre la superficie será equilibrada por la interacción superficial hidrófoba del glóbulo con la superficie del soporte, que actúa limitando el área total del glóbulo sobre la superficie, y por la tensión superficial de la gotita, que tiende a producir una curvatura dada del glóbulo. En este punto, se habrá formado un volumen dado de glóbulo, y la continuación del contacto de la punta del distribuidor con el glóbulo, cuando está siendo retirada la punta del distribuidor, tendrá poco o ningún efecto sobre el volumen del glóbulo.

Al distribuir un líquido sobre una superficie más hidrófila, el líquido tendrá menos tendencia a formar glóbulos y el volumen distribuido será más sensible al tiempo de permanencia total de la punta del distribuidor en la inmediata vecindad de la superficie del soporte, p. ej. las posiciones ilustradas en las Figuras 2B y 2C.

El deseado volumen de deposición, es decir, el volumen de un glóbulo, formado por este método, está preferiblemente en el margen desde 2 pl (picolitros) hasta 2 nl (nanolitros), aunque se pueden distribuir unos volúmenes tan altos como de

100 nl o más. Se apreciará que el volumen distribuido seleccionado dependerá (i) de la "huella" de la punta del distribuidor, es decir del tamaño del área abarcada por la punta, (ii) de la hidrofobia de la superficie del soporte, y (iii) del tiempo de contacto con esta superficie del soporte y la velocidad de retirada de la punta desde dicha superficie del soporte. Además, el tamaño de un glóbulo puede ser reducido aumentando la viscosidad del medio, reduciendo con ello de manera eficaz el tiempo de circulación del líquido desde el distribuidor hasta sobre la superficie del soporte. El tamaño de una gota puede ser restringido adicionalmente depositando la gota en una región hidrófila rodeada por un diseño de rejilla hidrófoba sobre la superficie del soporte.

En una realización típica, la punta del distribuidor es golpeada ligera y rápidamente contra la superficie de soporte, con un tiempo de permanencia total en contacto con el soporte de menos que aproximadamente 1 milisegundo (ms) y con una velocidad de desplazamiento hacia arriba desde la superficie de aproximadamente 10 cm/s.

Suponiendo que el glóbulo que se forma al entrar en contacto con la superficie sea un glóbulo semiesférico, con un diámetro aproximadamente igual a la anchura de la punta del distribuidor, como se muestra en la Figura 2C, en la Tabla 1 siguiente se da el volumen del glóbulo formado en relación con la anchura (d) de la punta del distribuidor. Como se observa, el volumen del glóbulo fluctúa entre 2 pl y 2 nl según se va aumentando la magnitud de la anchura desde aproximadamente 20 hasta 200 μm (micrómetros).

TABLA 1

d	Volumen (nl)
20 μm	2×10^{-3}
50 μm	$3,1 \times 10^{-2}$
100 μm	$2,5 \times 10^{-1}$
200 μm	2

Con un tamaño dado de la punta, el volumen de un glóbulo puede ser reducido de una manera controlada aumentando la hidrofobia de la superficie, reduciendo el tiempo de contacto de la punta con la superficie, aumentando la velocidad del movimiento de la punta alejándose desde la superficie, y/o aumentando la viscosidad del medio. Una vez que se hayan fijado estos parámetros, se puede conseguir de una manera repetible un volumen seleccionado de deposición en el margen deseado desde los pl hasta los nl.

Después de haber depositado un glóbulo en un sitio seleccionado sobre un soporte, se mueve la punta típicamente hasta una posición correspondiente sobre un segundo soporte, se deposita una gotita en esa posición, y se repite este proceso hasta que una gotita líquida del reactivo haya sido depositada en una posición seleccionada sobre cada soporte de una pluralidad de ellos.

Luego, la punta se lava para eliminar el líquido de reactivo, se carga con otro líquido de reactivo y este reactivo se deposita seguidamente en cada subsiguiente posición del conjunto sobre cada uno

de los soportes. En una realización, la punta se lava y vuelve a cargar mediante las operaciones de (i) sumergir el canal capilar del dispositivo en una solución de lavado, (ii) eliminar la solución de lavado arrastrada dentro del canal capilar, y (iii) sumergir el canal capilar en la nueva solución de reactivo.

A partir de lo que antecede, se apreciará que la punta del distribuidor de capilar abierto, similar a unas tenacillas, proporciona las ventajas de que (i) el canal abierto de la punta facilita un lavado eficiente y rápido y el secado antes de volver a cargar la punta con un nuevo reactivo, (ii) una acción capilar pasiva puede cargar la muestra directamente desde una placa clásica de micropocillos, al mismo tiempo que se retenga suficiente cantidad de muestra en el depósito capilar abierto para la impresión de numerosos conjuntos, (iii) los capilares abiertos son menos propensos a obstruirse que los capilares cerrados, y (iv) los capilares abiertos no requieren una superficie de fondo perfectamente acabada para suministrar fluidos.

Una porción de un microconjunto 36 formado sobre la superficie 38 de un soporte sólido 40 de acuerdo con el método que se acaba de describir, se muestra en la Figura 3. El conjunto está formado por una pluralidad de regiones de reactivos específicos para analitos, tales como regiones 42, en que cada región puede incluir un diferente reactivo específico para un analito. Como antes se indica, el diámetro de cada región está preferiblemente entre alrededor de 20 y 200 μm . La distancia entre cada región y su región vecina más próxima (no en sentido diagonal), medida de centro a centro (indicada por 44) está preferiblemente en el margen de aproximadamente 20-400 μm . Así, por ejemplo, un conjunto que tiene una separación de centro a centro de aproximadamente 250 μm contiene aproximadamente 40 regiones/cm o 1.600 regiones/cm². Después de la formación del conjunto, el soporte es tratado para evaporar el líquido de la gotita que forma cada región, para dejar un conjunto deseado de regiones secas, relativamente planas. Esta desecación puede hacerse por calentamiento o en vacío.

En algunos casos, se desea primeramente volver a hidratar las gotitas que contienen los reactivos para analitos con el fin de dejar más tiempo para la adsorción al soporte sólido. También es posible extender en motas los reactivos para analitos en un entorno húmedo de manera tal que las gotitas no se sequen hasta que esté completa la operación de formación de los conjuntos.

III. Aparato automático para formar conjuntos

En otro aspecto, el invento incluye un aparato automático para formar un conjunto de regiones de análisis de analitos sobre un soporte sólido, en que cada región en el conjunto tiene una cantidad conocida de un reactivo seleccionado, específico para un analito.

El aparato se muestra en vista plana y parcialmente esquemática en la Figura 4. Un dispositivo distribuidor 72 existente en el aparato tiene la estructura básica descrita antes con respecto a la Figura 1, e incluye un distribuidor 74 que tiene un canal capilar abierto que termina en una punta, sustancialmente tal como se muestra en las Figuras 1 y 2A-2C.

El distribuidor está montado en el dispositivo para moverse acercándose a, y alejándose de, una posición de distribución en la que la punta del distribuidor golpea ligeramente una superficie del soporte para suministrar un volumen seleccionado de una solución de reactivo, tal como antes se describe. Este movimiento es efectuado por un solenoide 76 tal como antes se describe. El solenoide 76 se encuentra bajo el control de una unidad de control 77 cuyo funcionamiento se describirá más adelante. El solenoide es citado también en el presente contexto como “unos medios distribuidores para mover el dispositivo a aplicación de golpeo ligero con un soporte, cuando el dispositivo está colocado en una posición definida del conjunto con respecto a ese soporte”.

El dispositivo distribuidor está soportado por un brazo 74 que está montado de manera roscable sobre un tornillo sinfín 80 propulsado (hecho girar) en una dirección deseada por un motor 82 de accionamiento gradual, también bajo el control de la unidad 77. En su extremo izquierdo en la figura, el tornillo 80 está soportado por un manguito 84 para girar en torno al eje de tornillo. En su otro extremo, el tornillo está montado en el árbol de accionamiento del motor de accionamiento gradual, que a su vez está soportado por un manguito 86. El dispositivo distribuidor, el tornillo sinfín, los dos manguitos que montan al tornillo sinfín, y el motor de accionamiento gradual, utilizado para mover el dispositivo en la dirección “x” (horizontal) en la figura, forman lo que se cita aquí colectivamente como un “conjunto para desplazamiento” 86.

El conjunto para desplazamiento está estructurado para producir un movimiento preciso en el margen de los micrómetros en la dirección del tornillo, es decir a lo largo de un eje “x” en la figura. En una modalidad, el conjunto funciona para mover el distribuidor por incrementos en el eje “x” que tienen una distancia seleccionada en el margen de 5-25 μm . En otra modalidad, la unidad distribuidora puede ser movida en incrementos exactos en el eje “x”, de varios micrómetros o más, para colocar el distribuidor en posiciones asociadas sobre soportes adyacentes, como se describirá seguidamente.

El conjunto para desplazamiento, a su vez, está montado para movimiento en el eje “y” (vertical) de la figura, para colocar el distribuidor en una posición seleccionada en el eje “y”. La estructura que monta el conjunto incluye una varilla fija 88 montada rigidamente entre un par de barras 90, 92 del bastidor, y un tornillo sinfín 94 montado para girar entre un par de barras 96, 98 del bastidor. El tornillo sinfín es propulsado (hecho girar) por un motor de accionamiento gradual 100 que funciona bajo el control de la unidad 77. El motor está montado sobre la barra 96, como se muestra.

La estructura que se acaba de describir, inclusive el tornillo sinfín 94 y el motor 100, está construida para producir un movimiento preciso en el margen de los micrómetros en la dirección del tornillo, es decir a lo largo de un eje “y” en la figura. Igual que anteriormente, la estructura funciona en una modalidad para mover el distribuidor por incrementos en el eje “y” que tienen

una distancia seleccionada en el margen de 5-250 μm , y en una segunda modalidad, para mover el distribuidor por incrementos exactos en el eje “y” de varios micrómetros (μm) o más, para colocar el distribuidor en posiciones asociadas sobre soportes adyacentes.

El conjunto de desplazamiento y la estructura para mover este conjunto en el eje “y” se citan en este contexto colectivamente como “medios de colocación” para colocar el dispositivo distribuidor en una posición seleccionada del grupo con respecto a un soporte.

Una montura de sostén 102 existente en el aparato funciona para sostener una pluralidad de soportes, tal como los soportes 104 sobre los cuales han de ser formados por el aparato los microconjuntos de regiones de reactivos. La montura de sostén proporciona un cierto número de ranuras rebajadas, tales como la ranura 106, que reciben a los soportes, y las coloca en posiciones seleccionadas exactas con respecto a las barras del bastidor en las que están montados los medios para movimiento del distribuidor.

Como antes se señala, la unidad de control en el dispositivo funciona para accionar a los dos motores de accionamiento gradual y al solenoide del distribuidor en una secuencia diseñada para un funcionamiento automático del aparato a fin de formar un microconjunto seleccionado de regiones de reactivos sobre cada soporte de una pluralidad de ellos.

La unidad de control está construida, de acuerdo con principios convencionales de control por microprocesadores, para proporcionar señales apropiadas a cada uno de los solenoides y a cada uno de los motores de accionamiento gradual, en una secuencia temporizada establecida y por un tiempo de señalización apropiado. La estructura de la unidad, y los ajustes que se seleccionan por el usuario para conseguir un diseño deseado de un conjunto, se entenderán a partir de la siguiente descripción de un funcionamiento típico del aparato.

Inicialmente, uno o más soportes se colocan dentro de una o más ranuras en la montura. El distribuidor es luego movido a una posición situada directamente por encima de un pocillo (no mostrado), que contiene una solución del primer reactivo que se ha de distribuir sobre el o los soporte(s). El solenoide del distribuidor es accionado ahora para hacer descender la punta del distribuidor dentro de este pocillo, dando lugar a que se llene el canal capilar del distribuidor. Ahora, los motores 82 y 100 son accionados para colocar el distribuidor en una posición seleccionada del conjunto en el primero de los soportes. El accionamiento del solenoide del distribuidor es entonces eficaz para distribuir una gotita de volumen seleccionado de este reactivo en este lugar. Como antes se señala, este funcionamiento es eficaz para distribuir un volumen seleccionado, preferiblemente entre 2 pl y 2 nl de la solución de reactivo.

Seguidamente, el distribuidor es movido a la posición correspondiente junto a un soporte adyacente y se suministra un volumen similar de la solución en esta posición. El proceso se repite hasta que el reactivo haya sido distribuido en esta po-

sición correspondiente preseleccionada sobre cada uno de los soportes.

Cuando se desea distribuir un único reactivo en más de dos posiciones de un conjunto sobre un soporte, el distribuidor puede ser movido hasta diferentes posiciones en el conjunto junto a cada soporte, antes de mover el distribuidor hasta un nuevo soporte, o se puede suministrar una solución en posiciones individuales sobre cada soporte, en una posición seleccionada, y luego se repite el ciclo para cada nuevas posición en el conjunto.

Para suministrar el siguiente reactivo, el distribuidor se coloca sobre una solución de lavado (no mostrada), y la punta del distribuidor se sumerge en, y se saca de, esta solución hasta que la solución de reactivo haya sido sustancialmente separada por lavado con respecto de la punta. La solución se puede eliminar desde la punta, después de cada inmersión, por vacío, por proyección de aire comprimido, con una esponja o de un modo similar.

La punta del distribuidor es sumergida seguidamente en un segundo pocillo de reactivo, y la punta llena es movida hasta una segunda posición seleccionada del conjunto en el primer soporte. El proceso de suministrar un reactivo en cada una de las correspondientes posiciones del segundo conjunto se lleva a cabo como anteriormente. Este proceso se repite hasta que se haya formado un microconjunto completo de soluciones de reactivos sobre cada uno de los soportes.

IV. *Substrato para el microconjunto*

Esta sección describe realizaciones de un substrato que tiene un microconjunto de polímeros biológicos soportados sobre la superficie del substrato. La subsección A describe un substrato de celdillas múltiples, conteniendo cada una de las celdillas de éste un microconjunto, y preferiblemente un microconjunto idéntico, de polímeros distintos, tales como polinucleótidos distintos, formado sobre una superficie porosa. La subsección B describe un microconjunto de polinucleótidos distintos unidos sobre un portaobjetos de vidrio que está revestido con un polímero poliacrílico.

A. *Substrato de celdillas múltiples*

La Figura 9 ilustra, en una vista en planta, un substrato 110 construido de acuerdo con el invento. El substrato tiene un conjunto rectangular 112 de 8 x 12 celdillas, tales como las celdillas 114, 116, formadas sobre la superficie del substrato. Con referencia a la Figura 10, cada celdilla, tal como la celdilla 114, soporta a su vez a un microconjunto 118 de biopolímeros distintos, tales como polipéptidos o polinucleótidos en regiones conocidas a las que se puede acceder del microconjunto. Dos de tales regiones que forman el microconjunto se indican en 120 y corresponden a regiones, tales como las regiones 42, que forman el microconjunto de biopolímeros distintos mostrados en la Figura 3.

El conjunto de 96 celdillas, mostrado en la Figura 9, tiene típicamente unas dimensiones de conjunto comprendidas aproximadamente entre 12 y 244 mm en cuanto a la anchura y entre 8 y 400 mm en cuanto a la longitud, teniendo las celdillas en el conjunto unas dimensiones de an-

chura y longitud de 1/12 y 1/8 de las dimensiones de anchura y longitud del conjunto, respectivamente, es decir, entre aproximadamente 1 y 20 mm en cuanto a la anchura y de 1 a 50 mm en cuanto a la longitud.

La estructura del substrato se muestra en sección transversal en la Figura 11, que es una vista en sección ampliada tomada a lo largo de la línea de observación 124 en la Figura 9. El substrato incluye un respaldo 126 impermeable al agua, tal como un portaobjetos de vidrio o una lámina de polímero rígido. Se ha formado sobre la superficie del respaldo una película 128 permeable al agua. La película se forma a base de un material de membrana porosa, tal como una membrana de nitrocelulosa, o un material de banda continua porosa, tal como un material polímero poroso de Nylon, polipropileno o PVDF. El espesor de la película está comprendido preferiblemente entre alrededor de 10 y 1.000 μm . La película puede ser aplicada al respaldo proyectando o aplicando como revestimiento un material sin curar sobre el respaldo, o aplicando una membrana previamente conformada al respaldo. El respaldo y la película se pueden obtener como una unidad previamente formada a partir de una fuente comercial, p. ej. una película de nitrocelulosa respaldada por un material plástico, que está disponible de la entidad Schleicher and Schuell Corporation.

Continuando la referencia a la Figura 11, la superficie cubierta por la película en el substrato es subdividida en un conjunto deseado de celdillas por líneas de rejilla impermeables al agua, tales como las líneas 130, 132, que se han infiltrado en la película hacia abajo hasta el nivel del respaldo, y se extienden por encima de la superficie de la película como se muestra, típicamente por una distancia de 100 a 2.000 μm por encima de la superficie de la película.

Las líneas de rejilla son formadas sobre el substrato extendiendo una solución de resina o elastómero, por lo demás capaz de fluir, dentro de una rejilla del conjunto, permitiendo que el material se infiltre en la película porosa hasta llegar al respaldo, y luego curando o endureciendo de otro modo las líneas de rejilla para formar el substrato de para el conjunto de celdillas.

Un material preferido para la rejilla es una silicona capaz de fluir disponible de Loctite Corporation. El material de barrera se puede extruir a través de una estrecha jeringa (p. ej., de calibre 22) utilizando presión neumática o presión mecánica. La jeringa es movida con relación al soporte sólido para imprimir los elementos de barrera como un diseño de rejilla. El glóbulo extruido de silicona se difunde por efecto de mecha dentro de los poros del soporte sólido y se cura para formar una barrera poco profunda impermeable al agua, que separa las regiones del soporte sólido.

En realizaciones alternativas, el elemento de barrera puede ser un material basado en cera o un material termoestable, tal como una resina epoxídica. El material de barrera puede ser también un polímero de curado por ultravioletas (UV), que es expuesto a una luz UV después de haber sido impreso sobre el soporte sólido. El ma-

terial de barrera puede también ser aplicado al soporte sólido utilizando técnicas de impresión tales como la de impresión por serigrafía. El material de barrera puede ser también una estampación para obturación térmica del soporte sólido poroso que obtura sus poros y forma un elemento de barrera impermeable al agua. El material de barrera puede ser también una rejilla poco profunda, que es estratificada o adherida de otro modo al soporte sólido.

Además de la nitrocelulosa respaldada por un material plástico, el soporte sólido puede ser virtualmente cualquier membrana porosa con o sin un respaldo no poroso. Tales membranas están fácilmente disponibles de numerosos vendedores y se producen a base de Nylon, PVDF, polisulfona y polímeros similares. En una realización alternativa, el elemento de barrera se puede utilizar también para adherir la membrana porosa a un respaldo no poroso, además de funcionar como una barrera para evitar una contaminación cruzada de los reactivos para análisis.

En una realización alternativa, el soporte sólido puede ser de un material no poroso. La barrera puede ser impresa o bien antes o después de que el microconjunto de biomoléculas haya sido impreso sobre el soporte sólido.

Como se puede apreciar, las celdillas formadas por las líneas de rejilla y el respaldo subyacente son impermeables al agua, teniendo barreras laterales que sobresalen por encima de la película porosa en las celdillas. De este modo, muestras con volúmenes definidos pueden ser colocadas dentro de cada pocillo sin riesgo de contaminación cruzada con el material de muestra existente en celdillas adyacentes. En la Figura 11, se presentan dentro de las celdillas muestras de volúmenes definidos tales como la muestra 134.

Tal como antes se señala, cada pocillo contiene un microconjunto de biopolímeros distintos. En una realización general, los microconjuntos presentes en el pocillo son conjuntos idénticos de biopolímeros distintos, p. ej. polinucleótidos de secuencias diferentes. Dichos conjuntos se pueden formar de acuerdo con los métodos descritos en la Sección II, depositando un primer polinucleótido seleccionado en la misma posición seleccionada de microconjunto dentro de cada una de las celdillas, luego depositando un segundo polinucleótido en una diferente posición de microconjunto dentro de cada pocillo, y así sucesivamente hasta que se forme en cada celdilla un microconjunto idéntico completo.

En una realización preferida, cada microconjunto contiene aproximadamente 103 biopolímeros polinucleótidos o polipéptidos distintos por unidad de área de superficie de menos de aproximadamente 1 cm². También en una realización preferida, los biopolímeros existentes en cada región del microconjunto están presentes en una cantidad definida comprendida entre alrededor de 0,1 femtomoles y 100 nanomoles. La capacidad para formar conjuntos de alta densidad de biopolímeros, en los que cada región está formada por una cantidad bien definida de material depositado, se puede conseguir de acuerdo con el método de formación de microconjuntos que se describe en la Sección II.

También en una realización preferida, los biopolímeros son polinucleótidos que tienen unas longitudes de al menos aproximadamente 50 pares de bases (pb), es decir sustancialmente más largos que los oligonucleótidos que se pueden formar en conjuntos de alta densidad por esquemas que implican una síntesis paralela y escalonada del polímero sobre la superficie de los conjuntos.

En el caso de un conjunto de polinucleótidos, en un proceso de análisis, un pequeño volumen de la mezcla de sonda de ADN marcado en una solución de hibridación normalizada, se carga sobre cada celdilla. La solución se desparramará para cubrir todo el microconjunto y se detendrá junto a los elementos de barrera. Luego el soporte sólido se incubará en una cámara húmeda a la temperatura apropiada, como se requiera por el análisis.

Cada análisis se puede realizar en un formato de "cara abierta" en el que no se requiere ninguna operación adicional de obturación, puesto que la solución de hibridación será mantenida apropiadamente hidratada por el vapor de agua en la cámara húmeda. A la conclusión de la operación de incubación, la totalidad del soporte sólido, que contiene los numerosos microconjuntos, se enjuaga con suficiente rapidez para diluir los reactivos para análisis de manera tal que no se produzca ninguna importante contaminación cruzada. Todo el soporte sólido se hace reaccionar luego con reactivos para detección, si se necesitan, y se analizan utilizando medios de detección colorimétricos, radiactivos o fluorescentes normalizados. Todas las operaciones de tratamiento y detección se realizan simultáneamente para todos los microconjuntos situados sobre el soporte sólido, asegurando unas condiciones uniformes del análisis para todos los microconjuntos situados sobre el soporte sólido.

B. Conjunto de polinucleótidos sobre un portaobjetos de vidrio

La Figura 5 muestra un substrato 136 formado de acuerdo con otro aspecto del invento y destinado a utilizarse en la detección de la unión de polinucleótidos marcados a uno o más entre una pluralidad de distintos polinucleótidos. El substrato incluye un substrato de vidrio 138 que tiene formado sobre su superficie un revestimiento de un polímero policatiónico, preferiblemente un polipéptido catiónico, tal como una polilisina o una poliarginina. Se ha formado sobre el revestimiento policatiónico un microconjunto 140 de polinucleótidos distintos, cada uno de ellos situado en regiones seleccionadas conocidas del conjunto, tales como las regiones 142.

El portaobjetos es revestido colocando una película de espesor uniforme de un polímero policatiónico, p. ej. de poli-l-lisina, sobre la superficie de un portaobjetos y secando la película para formar un revestimiento seco. La cantidad de polímero policatiónico que se añade es suficiente para formar por lo menos una monocapa de polímero sobre la superficie de vidrio. La película del polímero es unida a la superficie a través de una unión electrostática entre grupos silil-OH negativos sobre la superficie y grupos amino cargados eléctricamente en los polímeros. Los portaobjetos revestidos con poli-l-lisina se pueden obtener

comercialmente, p. ej. de la entidad Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO).

Para formar el microconjunto, se depositan volúmenes definidos de polinucleótidos distintos sobre el portaobjetos revestido con polímero, como se describe en la Sección II. De acuerdo con una característica importante del substrato, los polinucleótidos depositados permanecen unidos no covalentemente a la superficie revestida del portaobjetos cuando una muestra acuosa de ADN es aplicada al substrato en condiciones que permiten la hibridación de polinucleótidos marcados con reporteros en la muestra a polinucleótidos de secuencia complementaria (monocatenarios) en el conjunto del substrato. El método es ilustrado en los Ejemplos 1 y 2.

Para ilustrar esta característica, un substrato del tipo que se acaba de describir, pero que tenía un conjunto de polinucleótidos con la misma secuencia, se mezcló con ADN complementario marcado fluorescentemente en condiciones de hibridación. Después de haber lavado para eliminar el material no hibridado, el substrato se examinó mediante microscopía con fluorescencia de baja potencia. El conjunto puede ser visualizado por el reactivo de marcación relativamente uniforme de la regiones del conjunto.

En una realización preferida, cada microconjunto contiene por lo menos 103 biopolímeros polinucleótidos o polipéptidos distintos por unidad de área de superficie menor que aproximadamente 1 cm². En la realización mostrada en la Figura 5, el microconjunto contiene 400 regiones en un área de aproximadamente 16 mm², o 2,5 x 10³ regiones/cm². También en una realización preferida, los biopolímeros existentes en cada región del microconjunto están presentes en una cantidad definida entre aproximadamente 0,1 femtomoles y 100 nanomoles en el caso de los polinucleótidos. Igual que anteriormente, la capacidad para formar conjuntos de alta densidad de este tipo, en que cada región está formada por una cantidad bien definida de material depositado, se puede conseguir de acuerdo con el método para formar microconjuntos que se describe en la Sección II.

Los polinucleótidos tienen una longitud de por lo menos aproximadamente 50 pb, es decir son sustancialmente más largos que los oligonucleótidos que pueden ser formados en conjuntos de alta densidad por diversos esquemas de síntesis *in situ*.

V. Utilidad

Los microconjuntos de secuencias de ácidos nucleicos inmovilizados que se han preparado de acuerdo con el invento, pueden utilizarse para análisis de hibridación a gran escala en numerosas aplicaciones genéticas, inclusive el cartografiado genético y físico de los genomas, la vigilancia de la expresión de genes, la secuenciación de ADN, el diagnóstico genético, la genotipación de organismos y la distribución de reactivos de ADN a los investigadores.

Para el cartografiado de genes, un gen o un fragmento de ADN clonado es hibridado con un conjunto ordenado de fragmentos de ADN, y la identidad de los elementos de ADN aplicados a este conjunto se demuestra sin ambigüedad por el pixel o la pauta de pixeles del conjunto, que

se detectan. Una aplicación de tales conjuntos para crear un mapa genético es descrito por Nelson y colaboradores (1993). Para construir mapas físicos del genoma, se hibridan conjuntos de fragmentos de ADN clonados e inmovilizados con otros fragmentos clonados de ADN para determinar si los fragmentos clonados en la mezcla de sonda se solapan y por lo tanto son contiguos a los clones inmovilizados existentes en el conjunto. Por ejemplo Lehrach y colaboradores describen tal procedimiento.

Los conjuntos de fragmentos de ADN inmovilizados pueden ser utilizados también para diagnósticos genéticos. Como ilustración, un conjunto que contiene formas múltiples de un gen o varios genes mutado(s) se puede sondear con una mezcla marcada del ADN de un paciente, que preferentemente interactuará con solamente una de las versiones inmovilizadas del gen.

La detección de esta interacción puede conducir a un diagnóstico médico. Los conjuntos de fragmentos de ADN inmovilizados se pueden utilizar también en diagnósticos con sondas de ADN. Por ejemplo, la identidad de un microorganismo patógeno se puede demostrar sin ambigüedad hibridando una muestra del ADN de patógeno desconocido con un conjunto que contiene muchos tipos de ADN patogénicos conocidos. Una técnica similar se puede utilizar también para genotipar sin ambigüedad cualquier organismo. Otras moléculas de interés genético, tales como ADNc's y ARN's se pueden inmovilizar sobre el conjunto o alternativamente se pueden utilizar como la mezcla de sonda marcada que es aplicada al conjunto.

En una aplicación, un conjunto de clones de ADNc que representan a genes es hibridado con el ADNc total procedente de un organismo para vigilar la expresión de genes con finalidades de investigación o diagnóstico. La marcación del ADNc total procedente de una célula normal con un fluoróforo coloreado y del ADNc total procedente de una célula enferma con un fluoróforo de otro color distinto, y la hibridación simultánea de las dos muestras de ADNc con el mismo conjunto de clones de ADNc permite que la expresión diferencial de genes sea medida como la relación de las dos intensidades de fluoróforos. Este experimento en dos colores se puede utilizar para vigilar la expresión de genes en diferentes tipos de tejidos, estados de enfermedad, la respuesta a fármacos, o la respuesta a factores ambientales. Un ejemplo de este enfoque es ilustrado en el Ejemplo 2, que se describe con respecto a la Figura 8.

Por vía de ejemplo y sin implicar ninguna limitación del alcance, tal procedimiento se podría usar para explorar simultáneamente a muchos pacientes contra todas las mutaciones conocidas en un gen de una enfermedad. Este invento se podría utilizar en la forma de, por ejemplo, 96 microconjuntos idénticos de 0,9 cm x 2,2 cm producidos sobre una única lámina de 12 cm x 18 cm de nitrocelulosa respaldada con material plástico, en que cada microconjunto podría contener por ejemplo 100 fragmentos de ADN que representen todas las mutaciones conocidas de un gen dado. La región que interesa de cada una de las muestras de ADN de 96 pacientes se podría amplificar,

marcar e hibridar con los 96 conjuntos individuales, realizándose cada análisis en 100 microlitros de una solución para hibridación. Los elementos de barrera de caucho de silicona, con un espesor de aproximadamente 1 μm , situados entre conjuntos individuales impiden la contaminación cruzada de las muestras de un paciente, obturando los poros de la nitrocelulosa y actuando como una barrera física entre cada microconjunto. El soporte sólido que contiene la totalidad de los 96 microconjuntos analizados con las 96 muestras de pacientes, es incubado, enjuagado, detectado y analizado como una única lámina de material utilizando medios clásicos de detección radiactiva, fluorescente o colorimétrica (Maniatis y colaboradores, 1989). Con anterioridad, dicho proceso hubiera implicado la manipulación, la elaboración y el seguimiento de 96 membranas separadas en 96 membranas cerradas herméticamente y separadas. Tratando la totalidad de los 96 conjuntos como una única lámina de material, son posibles importantes ahorros de tiempo y costos.

El formato de análisis puede ser invertido cuando el ADN del paciente o del organismo es inmovilizado como los elementos de conjuntos y cada conjunto es hibridado con un diferente alelo mutado o marcador genético. El soporte sólido enrejillado se puede utilizar también para análisis ELISA paralelos que no se refieran a ADN. Además, el invento permite el uso de todos los métodos clásicos de detección sin la necesidad de retirar los elementos de barrera poco profundos a fin de llevar a cabo la operación de detección.

Además de las aplicaciones genéticas antes enumeradas, conjuntos de células enteras, péptidos, enzimas, anticuerpos, antígenos, receptores, ligandos, fosfolípidos, polímeros, preparaciones cogenéricas de fármacos o sustancias químicas, se pueden producir por los medios descritos en este invento para análisis de exploración a gran escala en diagnósticos médicos, descubrimiento de fármacos, biología molecular, inmunología y toxicología.

El aspecto de substrato de celdillas múltiples del invento permite la exploración rápida y conveniente de muchas sondas de ADN frente a muchos conjuntos ordenados de fragmentos de ADN. Esto elimina la necesidad de manipular y detectar muchos conjuntos individuales a fin de realizar exploraciones a gran escala para aplicaciones de investigación genética y diagnóstico. Numerosos microconjuntos pueden ser producidos sobre el mismo soporte sólido y cada microconjunto se puede hacer reaccionar con una diferente sonda de ADN mientras que el soporte sólido está siendo tratado como una única lámina de material.

Los siguientes ejemplos ilustran el presente invento, pero de ninguna manera están destinados a limitarlo.

Ejemplo 1

Hibridación de complejidad genómica con microconjuntos de ADN que representan el genoma de la levadura Saccharomyces cerevisiae con detección fluorescente en dos colores

Los elementos de conjuntos eran productos de PCR amplificados aleatoriamente (Bohlander y colaboradores, 1992) utilizando clones lambda cartografiados físicamente de moldes de ADN

genómico de *S. cerevisiae* (Riles y colaboradores, 1993). La PCR fue realizada directamente en los materiales lisados de fagos lambda dando como resultado una amplificación tanto del vector lambda de 35 kb como de las secuencias del inserto de levadura de 5-15 kb en la forma de una distribución uniforme del producto de PCR que tiene una longitud comprendida entre 250 y 1.500 pares de bases. El producto de PCR se purificó utilizando una filtración a través de gel de Sephadex G50 (Pharmacia, Piscataway, NJ) y se concentró por evaporación hasta sequedad a la temperatura ambiente durante una noche. Cada uno de los 864 clones lambda amplificados fue rehidratado en 15 μl de 3 x SSC como preparación para la aplicación en motas (moteado) sobre el vidrio.

Los microconjuntos fueron producidos sobre portaobjetos de microscopio, que fueron revestidos con una capa de poli-l-lisina (Sigma). El aparato automático descrito en la Sección IV cargaba 1 μl del producto de PCR de un clon lambda concentrado en 3 x SSC directamente a partir de placas de almacenamiento de 96 pocillos dentro del elemento impresor capilar abierto y depositaba ~ 5 nl de muestra por cada portaobjetos a una distancia de 380 micrómetros entre motas, sobre cada uno de 40 portaobjetos. El proceso se repitió para la totalidad de las 864 muestras y 8 motas de control. Después de que se hubiera completado la operación de moteado, los portaobjetos fueron vueltos a hidratar en una cámara húmeda durante 2 horas, cocidos en una estufa a vacío seca a 80°C durante 3 horas, enjuagados para eliminar el ADN sin absorber y luego tratados con anhídrido succínico para reducir la adsorción inespecífica de la sonda de hibridación marcada a la superficie de vidrio revestida con poli-l-lisina. Inmediatamente antes del uso, el ADN inmovilizado situado sobre el conjunto fue desnaturalizado en agua destilada a 90°C durante 2 minutos.

Para el experimento de cromosomas agrupados, los 16 cromosomas de *Saccharomyces cerevisiae* fueron separados en un aparato con gel de agarosa CHEF (Biorad, Richmond, CA). Los seis cromosomas de mayor tamaño fueron aislados en una rodaja de gel y los 10 cromosomas de menor tamaño lo fueron en una segunda rodaja de gel. El ADN fue recuperado utilizando un estuche de ensayo para extracción con gel (Qiagen, Chatsworth, CA). Las dos agrupaciones de cromosomas fueron amplificadas aleatoriamente de una manera similar a la utilizada para los clones lambda dianas. Después de la amplificación, 5 microgramos de cada una de las agrupaciones de cromosomas amplificados fueron marcados con un cebador aleatoriamente por separado utilizando la polimerasa de Klenow (Amersham, Arlington Heights IL) con un compuesto análogo a un nucleótido conjugado con lissamina (Dupont NEN, Boston, MA) para la agrupación que contenía los seis cromosomas de mayor tamaño, y con un compuesto análogo a nucleótido conjugado con fluoresceína (BMB) para la agrupación que contenía los diez cromosomas de menor tamaño. Las dos agrupaciones fueron mezcladas y concentradas utilizando un dispositivo de ultrafiltración (Amicon, Danvers, MA).

Cinco microgramos de la sonda de hibridación

que constaba de ambas agrupaciones de cromosomas en 7,5 μ l de TE se desnaturalizaron en un baño de agua hirviendo y luego se enfriaron bruscamente sobre hielo. Se añadieron 2,5 μ l de solución de hibridación concentrada (5 x SSC y SDS al 0,1 %) y la totalidad de los 10 μ l se transfirió a la superficie de los conjuntos, se cubrió con un cubreobjetos, se colocó dentro de una cámara húmeda con un único portaobjetos estructurado según las necesidades, y se incubó a 60°C durante 12 horas. Los portaobjetos fueron luego enjuagados a la temperatura ambiente en 0,1 x SSC y SDS al 0,1 % durante 5 minutos, cubiertos con cubreobjetos y explorados.

Un explorador fluorescente de láser construido según las necesidades se utilizó para detectar las señales de hibridación en dos colores procedentes del conjunto de 1,8 x 1,8 cm con una resolución de 20 micrómetros. La imagen explorada fue subdividida por enrejillado y analizada utilizando un sistema lógico acostumbrado para análisis de imágenes. Después de haber corregido en cuanto a la diafotía óptica entre los fluoróforos debido a sus espectros de emisión solapados, los valores de hibridación de rojo y verde para cada clon en el conjunto fueron correlacionados con la conocida posición en el mapa físico del clon dando como resultado un cariotipo en colores generado por ordenador del genoma de la levadura.

La Figura 6 muestra el diseño de hibridación de las dos agrupaciones de cromosomas. Una señal roja indica que el clon lambda situado sobre la superficie del conjunto contiene un segmento de ADN genómico clonado procedente de uno de los seis cromosomas de mayor tamaño de la levadura. Una señal verde indica que el inserto de clon lambda procede de uno de los diez cromosomas de menor tamaño de la levadura. Las señales anaranjadas indican secuencias periódicamente repetidas que se hibridan de modo cruzado con ambas agrupaciones de cromosomas. Unas motas testigos sobre el conjunto confirman que la hibridación es específica y reproducible.

Las situaciones en un mapa físico de los fragmentos de ADN genómicos contenidos en cada uno de los clones utilizados como elementos de conjuntos han sido previamente determinadas por Olsson y colaboradores (Riles y colaboradores) permitiendo la generación automática del cariotipo en colores que se muestra en la Figura 7. El color de una sección de cromosoma en el cariotipo corresponde al color del elemento de conjunto que contiene el clon procedente de esa sección. Las regiones en negro del cariotipo representan motas oscuras falsamente negativas en el conjunto (10 %) o regiones del genoma que no están cubiertas por la genoteca de clones de Olsson (90 %). Obsérvese que los seis cromosomas de mayor tamaño son principalmente rojos mientras que los diez cromosomas de menor tamaño son principalmente verdes equiparándose al aislamiento en gel CHEF original de la sonda de hibridación. Las zonas de los cromosomas en rojo que contienen motas verdes, y viceversa, son probablemente debidas a errores de seguimiento de muestras espurias en la formación de la genoteca original y en los procesos de amplificación y moteado.

Los conjuntos de genomas de levadura han sido también sondeados con clones individuales o agrupaciones de clones que se han marcados fluorescentemente para finalidades de cartografiado físico. Las señales de hibridación de estos clones con el conjunto fueron traducidas a una posición sobre el mapa físico de la levadura.

Ejemplo 2

ADNc total hibridado a microconjuntos de clones de ADNc con detección fluorescente en dos colores

24 Clones que contenían insertos de ADNc procedentes de la planta *Arabidopsis* fueron amplificados utilizando una PCR. Se añadió una sal a los productos purificados de la PCR hasta una concentración final de 3 x SSC. Los clones de ADNc fueron moteados sobre portaobjetos de microscopio revestidos con poli-l-lisina, de una manera similar a la del Ejemplo 1. Entre los clones de ADNc había un clon que representaba a un factor de transcripción HAT 4, que se había utilizado previamente para crear una línea transgénica de la planta *Arabidopsis*, en que este gen está presente en un nivel diez veces mayor que el encontrado en *Arabidopsis* de tipo salvaje (Schna y colaboradores, 1992).

El ARNm de poli-A total procedente de *Arabidopsis* de tipo salvaje se aisló utilizando métodos clásicos (Maniatis y colaboradores, 1989) y fue transcrito inversamente en el ADNc total utilizando un compuesto análogo a nucleótido con fluoresceína para marcar el producto de ADNc (fluorescencia verde). Se realizó un proceso similar con la línea transgénica de *Arabidopsis* en la que el factor de transcripción HAT 4 había sido insertado en el genoma utilizando protocolos clásicos de transferencia de genes. Las copias de ADNc de un ARNm procedente de la planta transgénica son marcadas con un compuesto análogo a nucleótido con lissamina (fluorescencia roja). Dos microgramos de los productos de ADNc procedentes de cada tipo de planta fueron agrupados conjuntamente e hibridados con el conjunto de clones de ADNc en una reacción de hibridación de 10 microlitros, de una manera similar al Ejemplo 1. El enjuague y la detección de la hibridación se realizaron también de una manera similar a la del Ejemplo 1. La Figura 8 muestra el modelo de hibridación resultante del conjunto.

Genes expresados de igual manera en una *Arabidopsis* de tipo salvaje y en la *Arabidopsis* transgénica aparecieron coloreados de amarillo debido a las iguales contribuciones de las fluorescencias verde y roja a la señal final. Las motas son de diferentes intensidades de amarillo, indicando diversos niveles de expresión de genes. El clon de ADNc que representa al factor de transcripción HAT 4, expresado en la línea transgénica de *Arabidopsis* pero no expresado detectablemente en *Arabidopsis* de tipo salvaje, aparece como una mota roja (apuntando la flecha hacia ella), indicando la expresión preferente del factor de transcripción en la *Arabidopsis* transgénica marcada de rojo y la falta relativa de expresión del factor de transcripción en la *Arabidopsis* de tipo salvaje marcada de verde.

Una ventaja del formato de hibridación de mi-

croconjuntos para estudios de expresión de genes, es la alta concentración parcial de cada especie de ADNc que se puede conseguir en la reacción de hibridación de 10 microlitros. Esta alta concentración parcial permite la detección de transcritos raros sin la necesidad de una amplificación por PCR de la sonda de hibridación, que puede influir sobre la verdadera representación genética de cada especie de ADNc discreto.

Estudios de expresión de genes, tales como éstos, se pueden utilizar para una investigación genómica con el fin de descubrir cuáles genes son expresados en qué tipos de células, estados de enfermedad, estados de desarrollo o condiciones ambientales. Se pueden utilizar también estudios de expresión de genes para el diagnóstico de una enfermedad correlacionando empíricamente los modelos de expresión de genes con estados de enfermedad.

Ejemplo 3

Hibridación colorimétrica multiplexada sobre un soporte sólido enrejillado

Una lámina de nitrocelulosa respaldada por un material plástico fue enrejillada con elementos de barrera hechos de un caucho de silicona, de acuerdo con la descripción dada en la Sección IV-A. La lámina fue empapada en 10 x SSC y dejada secarse. Como se muestra en la Figura 12, 192 clones de M13, cada uno con un diferente inserto de levadura, fueron agrupados en

conjuntos a una distancia de 400 micrómetros en cuatro cuadrantes del soporte sólido, utilizando el dispositivo automático descrito en la Sección III. El cuadrante izquierdo inferior sirvió como testigo negativo para hibridación mientras que cada uno de los otros tres cuadrantes fue hibridado simultáneamente con un diferente oligonucleótido utilizando la tecnología de hibridación de cara abierta que se describe en la Sección IV-A. Los primeros dos elementos y los últimos cuatro elementos de cada agrupación son testigos positivos para la operación de detección colorimétrica.

Los oligonucleótidos fueron marcados con la fluoresceína que había sido detectada utilizando un anticuerpo anti-fluoresceína conjugado con fosfatasa alcalina, que había precipitado un colorante NBT/BCIP sobre el soporte sólido (Amersham). Las perfectas conjugaciones entre los oligómeros marcados y los clones de M13 dieron como resultado motas oscuras visibles a simple vista y detectadas utilizando un rastreador óptico (HP ScanJet II) acoplado a un ordenador personal. Los diseños de hibridación son diferentes en cada uno de los cuadrantes, indicando que cada oligo encontró varios clones de M13 singulares entre los 192, con una perfecta conjugación de secuencias. Obsérvese que la punta de impresión de capilar abierto deja hoyuelos detectables sobre la nitrocelulosa, que se pueden utilizar para alinear y analizar las imágenes automáticamente.

REIVINDICACIONES

1. Un método para formar un microconjunto de regiones de análisis específicas para un analito sobre un soporte sólido o una pluralidad de soportes sólidos, que comprende:

- (a) cargar una solución de un reactivo de análisis específico para un analito en un dispositivo distribuidor de reactivos, que tiene un canal capilar alargado (i) formado por miembros alargados de la misma extensión y separados entre sí, (ii) destinado a retener una cantidad seleccionada de la solución de reactivo, y (iii) que tiene una región de punta en la que la solución de reactivo existente en el canal forma un menisco,
- (b) golpear ligeramente la punta del dispositivo distribuidor contra el soporte sólido en una posición definida del soporte sólido, con un impulso eficaz para romper el menisco en el canal capilar y depositar un volumen seleccionado de la solución de reactivo sobre el o los soporte(s) sólido(s), y
- (c) repetir las operaciones (a) y (b) con diferentes reactivos de análisis específicos para analitos, depositados en diferentes posiciones definidas sobre el o los soporte(s) sólido(s), hasta que se formen el o los microconjunto(s).

2. Un método de formar un microconjunto de regiones discretas de análisis, específicas para analitos, sobre un soporte sólido o una pluralidad de soportes sólidos, en que cada región discreta en el microconjunto tiene un reactivo de análisis seleccionado, específico para un analito, comprendiendo dicho método:

- (a) cargar una solución de un reactivo de análisis seleccionado, específico para un analito, en un dispositivo distribuidor de reactivos, que tiene un canal capilar alargado destinado a retener una cierta cantidad de la solución de reactivo y que tiene una región de punta en la que el canal es de costados abiertos y la solución de reactivo en el canal forma un menisco,
- (b) golpear ligeramente la punta del dispositivo distribuidor contra el soporte sólido en una posición definida sobre el soporte sólido, con un impulso eficaz para romper el menisco en el canal capilar y depositar un volumen seleccionado de la solución de reactivo sobre el o los soporte(s) sólido(s), y
- (c) repetir las operaciones (a) y (b) con diferentes reactivos de análisis específicos para analitos, depositados en diferentes posiciones definidas sobre el o los soporte(s) sólido(s), hasta que se formen el o los microconjunto(s).

3. Un método de formar un microconjunto de regiones discretas de análisis, específicas para analitos, sobre un soporte sólido o una pluralidad de soportes sólidos, en que cada región discreta en el microconjunto tiene un reactivo de análisis seleccionado, específico para un analito, comprendiendo dicho método:

- (a) cargar una solución de un reactivo de análisis seleccionado, específico para un analito, en un dispositivo distribuidor de reactivos, que tiene un canal capilar alargado destinado a contener una cantidad de la solución de reactivo y que tiene una región de punta en la que la solución de reactivo existente en el canal forma un menisco,
- (b) golpear ligeramente la punta del dispositivo distribuidor contra el soporte sólido en una posición definida sobre el soporte sólido, con un impulso eficaz para romper el menisco en el canal capilar y depositar un volumen seleccionado comprendido entre 0,002 y 2 nl de la solución de reactivo sobre el o los soporte(s) sólido(s), y
- (c) repetir las operaciones (a) y (b) con diferentes reactivos de análisis específicos para analitos, depositados en diferentes posiciones definidas sobre el o los soporte(s) sólido(s) hasta que se formen el o los microconjunto(s).

4. El método de las reivindicaciones 1, 2 ó 3, en el que los reactivos de análisis específicos para un analito son cadenas de ácidos nucleicos y en que el microconjunto tiene al menos aproximadamente 1.000 regiones discretas por cm^2 del soporte sólido.

5. El método de la reivindicación 4, en el que las cadenas de ácido nucleico son polinucleótidos distintos y en el que cada polinucleótido distinto está colocado en una región separada del microconjunto.

6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende, después de haber realizado las operaciones (a) y (b), la operación de volver a cargar el dispositivo distribuidor de reactivos con una nueva solución de reactivo de análisis específico para un analito mediante las operaciones de (i) sumergir el canal capilar del dispositivo en una solución de lavado, (ii) eliminar la solución de lavado arrastrada dentro del canal capilar, y (iii) sumergir el canal capilar en la nueva solución de reactivo.

7. El método de las reivindicaciones 5 ó 6, que comprende la operación de inmovilizar los polinucleótidos distintos en las regiones separadas del microconjunto.

8. Un método de formar un microconjunto de polinucleótidos con una longitud de más de 50 subunidades sobre un soporte sólido, en el que el microconjunto tiene al menos aproximadamente 1.000 regiones discretas por cm^2 de un soporte sólido, que comprende la operación de depositar por acción capilar los polinucleótidos sobre el soporte sólido.

9. El método de la reivindicación 8, en el que las cadenas de ácidos nucleicos son polinucleótidos distintos y en el que cada polinucleótido distinto está situado sobre una región separada del microconjunto.

10. El método de la reivindicación 9, en el que (a) la superficie del soporte sólido es hidrófoba y (b) cada región del microconjunto tiene un polinucleótido específico que es diferente de los polinucleótidos de otras regiones en el microconjunto.

11. Un aparato útil para formar un microcon-

junto de regiones de análisis de analitos sobre una pluralidad de soportes sólidos, en el que cada región tiene un reactivo seleccionado, específico para un analito, que comprende

- (a) una montura para sostener, en posiciones conocidas, una pluralidad de soportes planos,
- (b) un dispositivo distribuidor de reactivos que tiene un canal capilar alargado destinado a contener una cantidad de la solución de reactivo y que tiene una región de punta en la que el canal es de costados abiertos y la solución de reactivo existente en el canal forma un menisco,
- (c) medios de colocación para colocar el dispositivo distribuidor en una posición seleccionada del conjunto con respecto a un soporte en dicha montura,
- (d) medios distribuidores para mover el dispositivo a aplicación de golpeo ligero contra un soporte con un impulso seleccionado, cuando el dispositivo distribuidor está colocado en una posición definida del microconjunto con respecto a ese soporte, con un impulso eficaz para romper el menisco de líquido en el canal capilar y depositar un volumen seleccionado de solución sobre la superficie, y
- (e) medios de control para controlar y posicionar los medios distribuidores.

12. El aparato de la reivindicación 11, en el que el dispositivo suministrador de reactivos deposita entre aproximadamente 0,002 y 100 nl del reactivo para análisis específico para un analito en cada región del microconjunto.

13. Un sustrato con una superficie que comprende un microconjunto de distintos polinucleótidos, en el que (i) el microconjunto tiene al menos aproximadamente 1.000 regiones discretas de polinucleótidos por cm^2 de superficie del sustrato, (ii) cada polinucleótido distinto está colocado en una región separada del microconjunto, y (iii) cada polinucleótido distinto tiene una longitud de al menos 50 subunidades.

14. Un sustrato con una superficie que comprende un microconjunto de polinucleótidos distintos que tienen una longitud de al menos 50 subunidades, obtenible por el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el microconjunto tiene al menos aproximadamente

1.000 regiones discretas de polinucleótidos distintos por cm^2 de superficie del sustrato.

15. El sustrato de la reivindicación 13 ó 14, en el que la superficie del sustrato es hidrófoba.

16. El sustrato de la reivindicación 13 ó 14, en el que este sustrato es de vidrio.

17. El sustrato de una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16, en el que los polinucleótidos son secuencias derivadas de ARNm, secuencias de ADN genómico o fragmentos de ellas.

18. Un método para determinar las cantidades relativas de un polinucleótido en primeras y segundas mezclas de polinucleótidos, que comprende

- (a) marcar los polinucleótidos procedentes de las mezclas primera y segunda con unos reporteros primero y segundo, respectivamente, en que los reporteros primero y segundo son detectables independientemente y son compatibles con un sistema de detección por fluorescencia,
- (b) poner en contacto ambas mezclas de polinucleótidos marcados, en condiciones de hibridación, con un microconjunto que comprende distintos polinucleótidos con una longitud mayor que 50 subunidades, y
- (c) detectar la fluorescencia asociada con los reporteros primero y segundo en cada lugar en el microconjunto,

en que el microconjunto es un microconjunto como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 17.

19. El método de la reivindicación 18, en el que las mezclas primera y segunda se obtienen a partir de unos tipos primero y segundo de células.

20. El método de la reivindicación 18 ó 19, destinado a utilizarse en la determinación de los niveles relativos de expresión de una pluralidad de genes en un tipo de células, en el que los polinucleótidos marcados se obtienen a partir de ARNm's del tipo de células.

21. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 18 a 20 destinado a utilizarse en la determinación de los niveles relativos de expresión de un gen en un tipo primero y un tipo segundo de células, en el que los polinucleótidos marcados se obtienen a partir de los ARNm's de los tipos primero y segundo de células.

22. El método de la reivindicación 20 ó 21, en el que los polinucleótidos son ADNc's.

NOTA INFORMATIVA: Conforme a la reserva del art. 167.2 del Convenio de Patentes Europeas (CPE) y a la Disposición Transitoria del RD 2424/1986, de 10 de octubre, relativo a la aplicación del Convenio de Patente Europea, las patentes europeas que designen a España y solicitadas antes del 7-10-1992, no producirán ningún efecto en España en la medida en que confieran protección a productos químicos y farmacéuticos como tales.

Esta información no prejuzga que la patente esté o no incluida en la mencionada reserva.

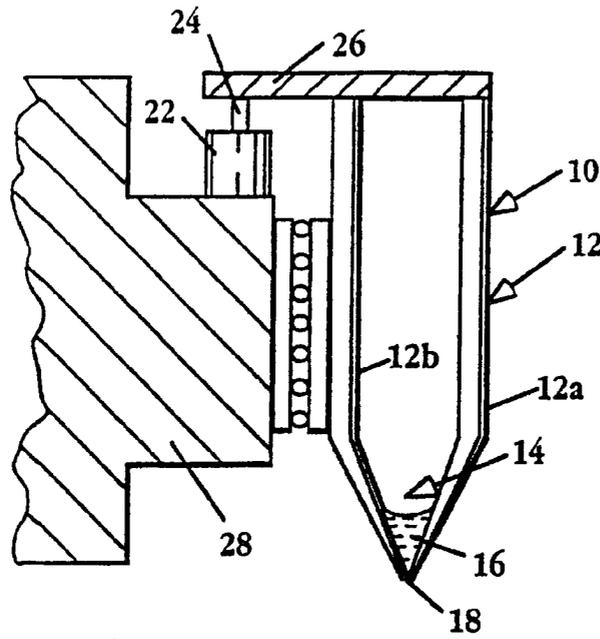


Fig. 1

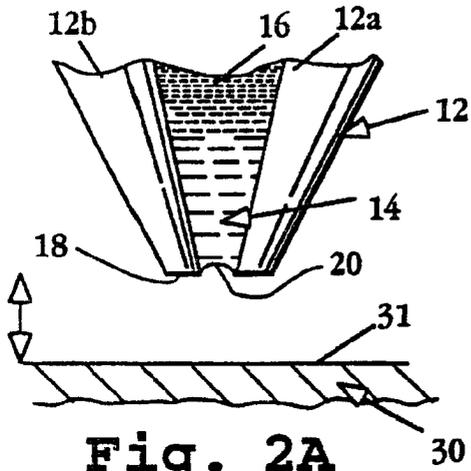


Fig. 2A

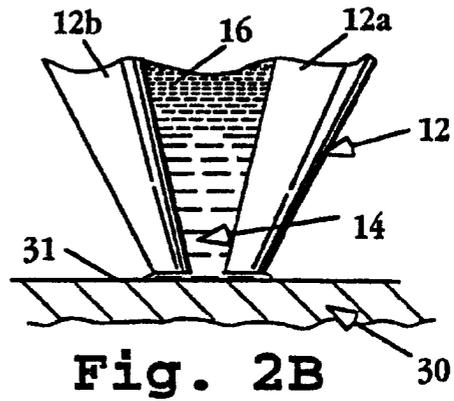


Fig. 2B

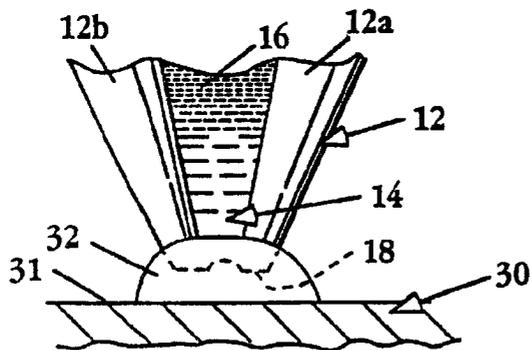


Fig. 2C

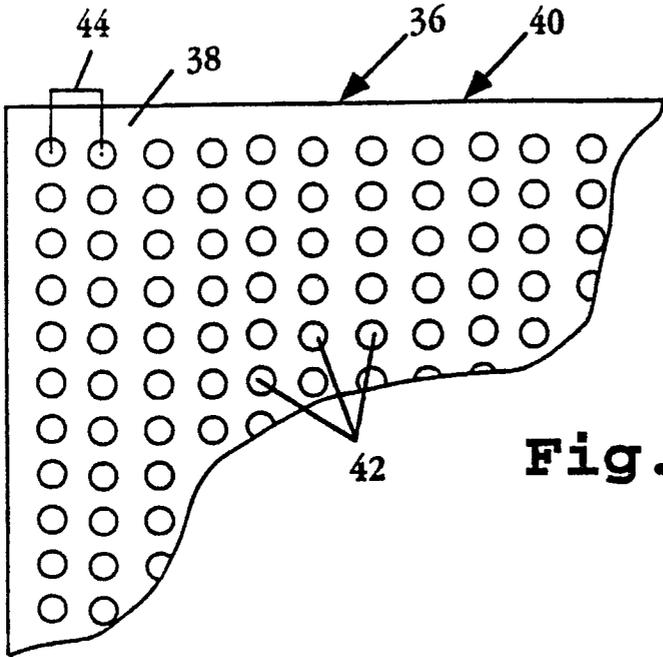


Fig. 3

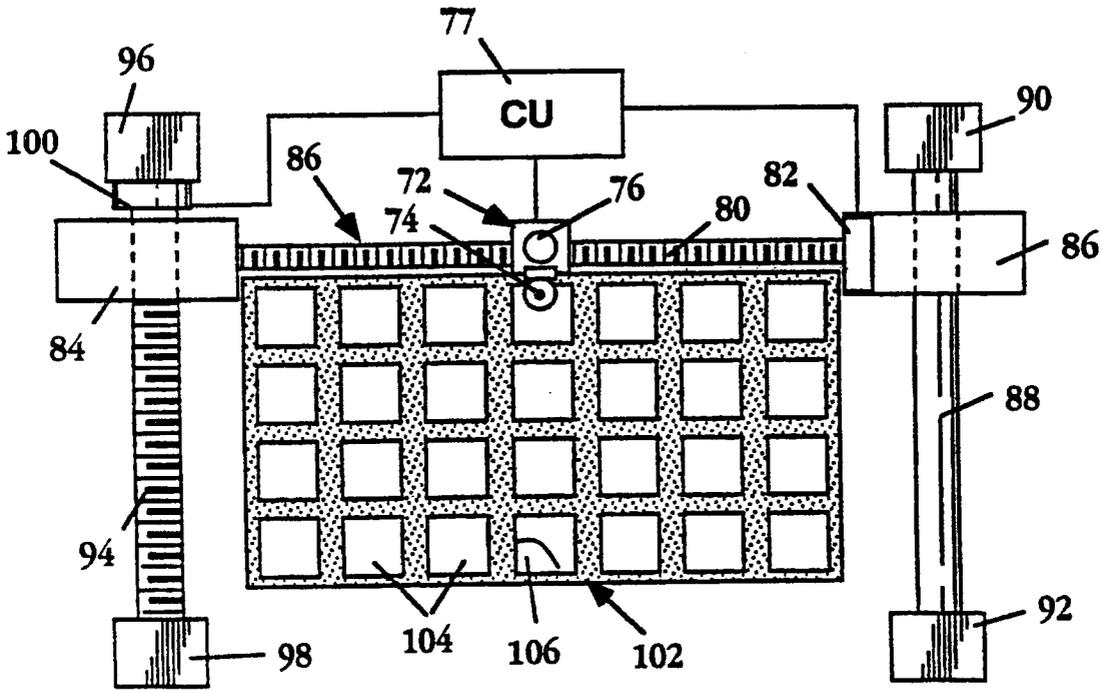


Fig. 4

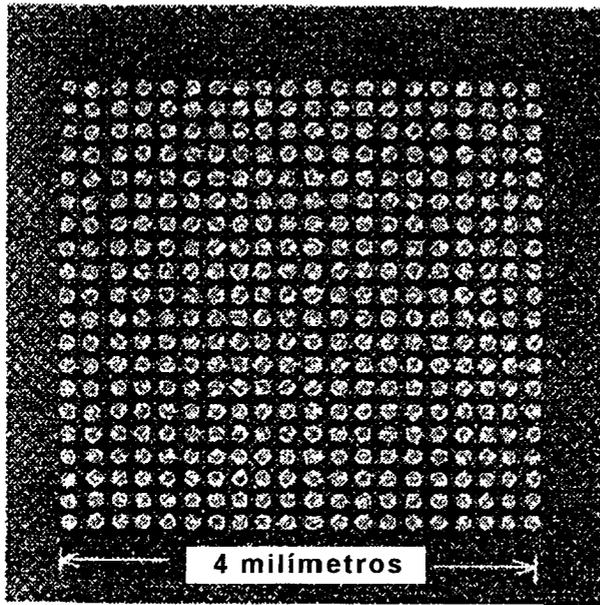


Fig. 5

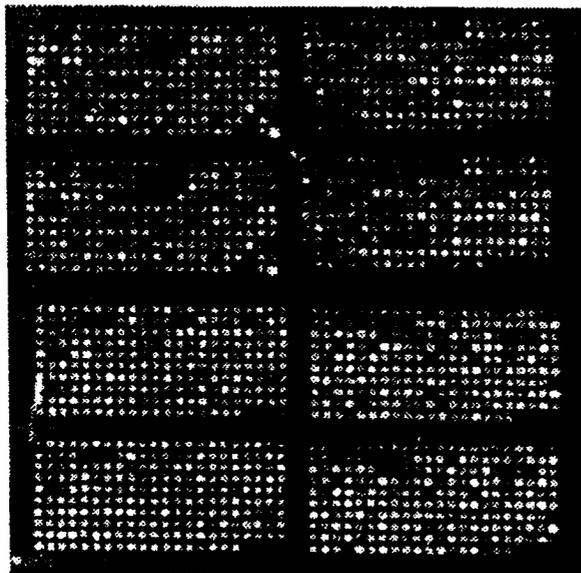


Fig. 6

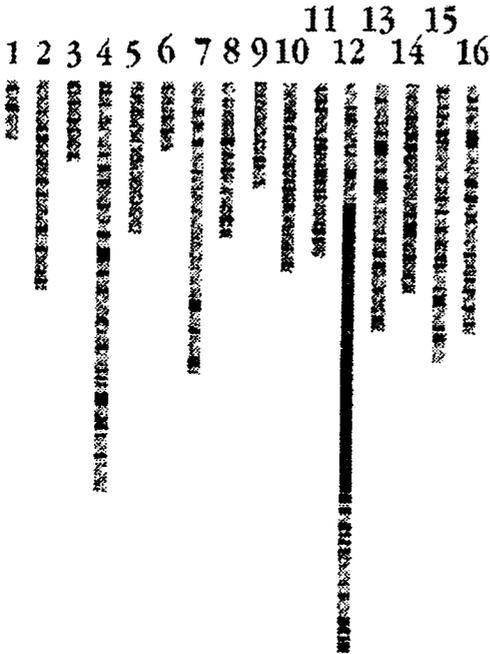


Fig. 7

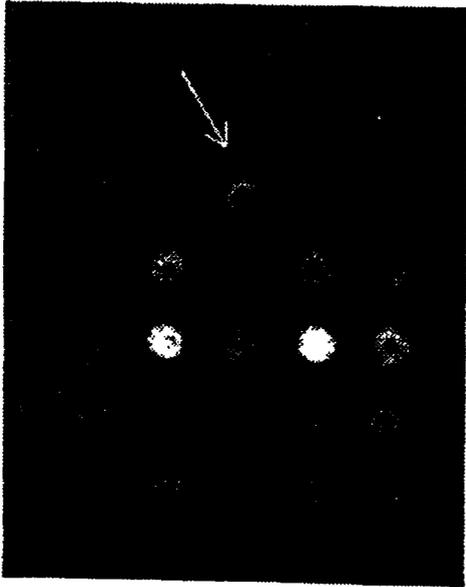


Fig. 8

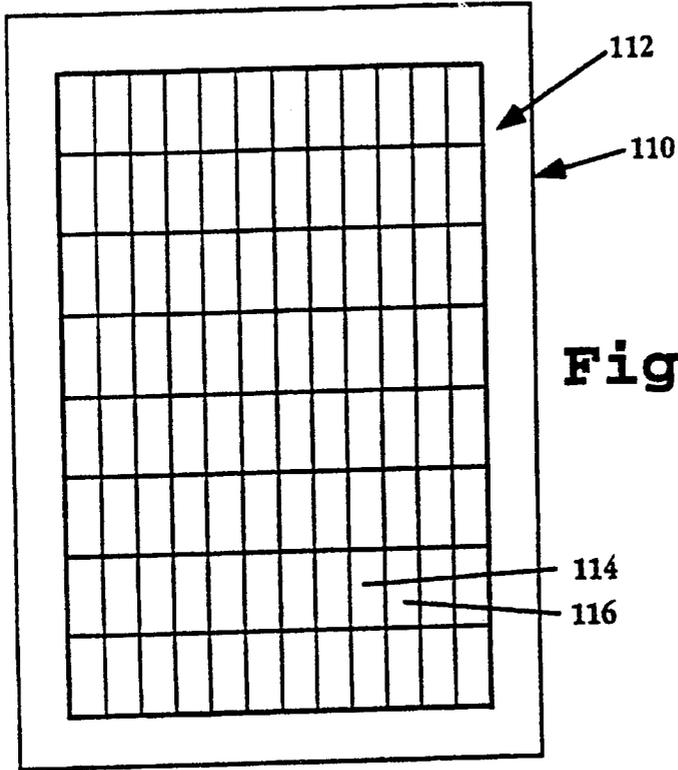


Fig. 9

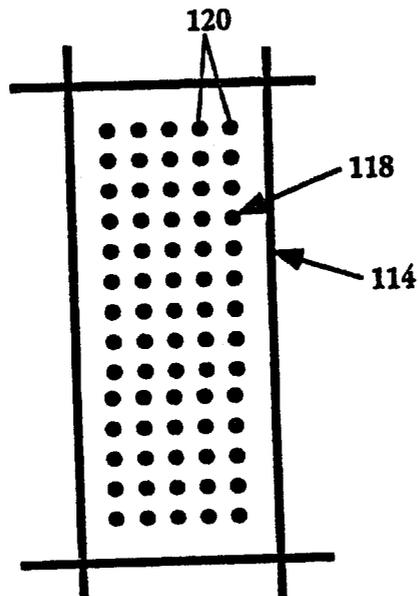


Fig. 10

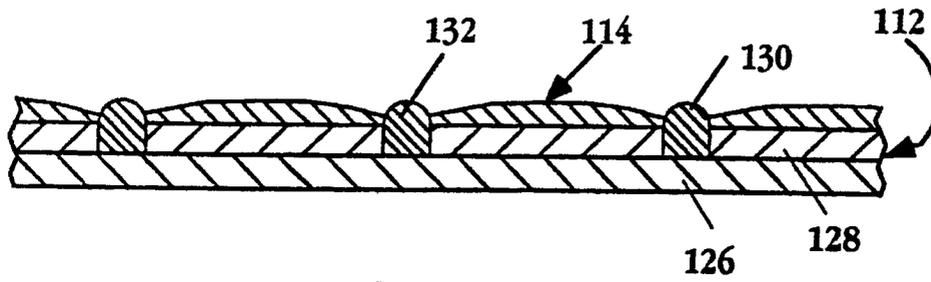


Fig. 11

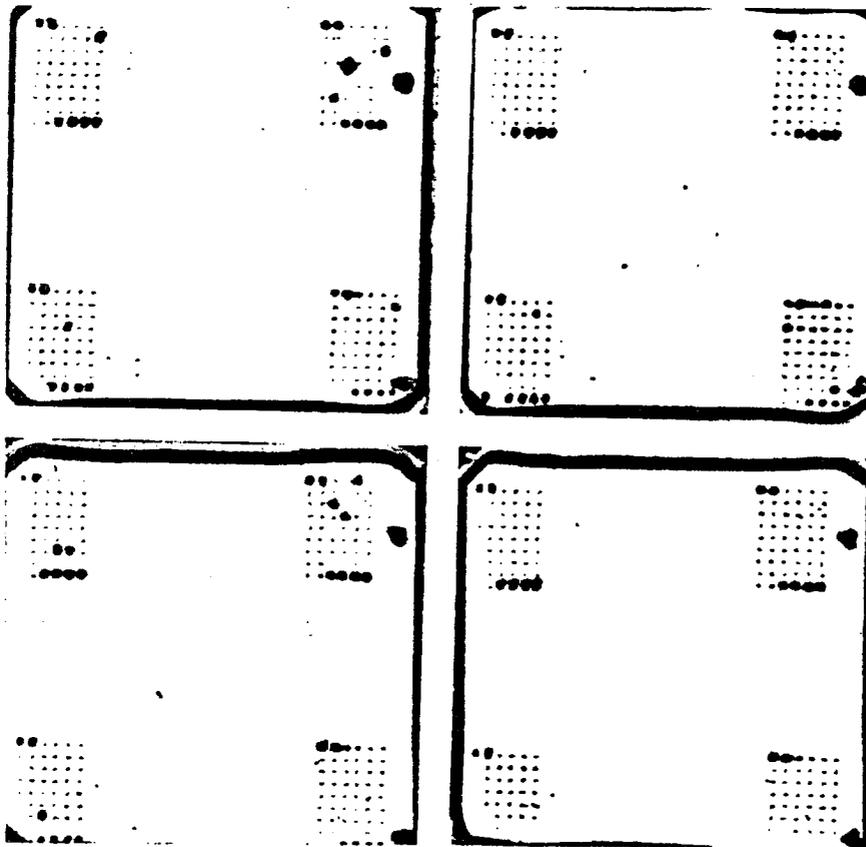


Fig. 12