(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 358 508**

(51) Int. Cl.:
G01N 21/77 (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01)
G01N 21/55 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **04002064 .6**
(96) Fecha de presentación : **20.09.1995**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1441217**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **28.07.2004**

(54) Título: **Método de guía de ondas óptica para detectar acontecimientos de unión específica mediante difusión de la luz.**

(30) Prioridad: **22.09.1994 US 311462**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI: **11.05.2011**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente: **11.05.2011**

(73) Titular/es: **ABBOTT LABORATORIES**
100 Abbott Park Road
Abbott Park, Illinois 60064, US

(72) Inventor/es: **Stimpson, Donald I.;**
Gordon, Julian y
Hoijer, Joanell V.

(74) Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 358 508 T3

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 (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método de guía de ondas óptica para detectar acontecimientos de unión específica mediante difusión de la luz

Campo de la invención

La invención se refiere a varios campos, especialmente a interacciones de componentes de unión específica, guías de ondas evanescentes y a la difusión de la luz. Más particularmente, la invención se refiere a un procedimiento de detección de uno o más analitos de unión específica, especialmente ADN u oligonucleótidos, mediante técnicas de difusión de la luz, produciéndose la difusión por una marca particulada mantenida mediante fuerzas de unión específica dentro de la profundidad de penetración de la onda evanescente de una guía de ondas.

Antecedentes de la invención

La reflexión interna total ("TIR") se conoce en la técnica y se describe con referencia a la Figura 1. La TIR funciona según el principio de que la luz 10 que se desplaza en un medio 12 más denso (es decir, que tiene el mayor índice de refracción, N_1) y choca con la superficie 14 de separación entre el medio más denso y un medio 16 más raro (es decir, que tiene el menor índice de refracción, N_2) es totalmente reflejada dentro del medio 12 más denso si choca contra la superficie de separación con un ángulo, θ_R, mayor que el ángulo crítico, θ_C, definiéndose el ángulo crítico por la ecuación:

$$\theta_c = \text{arcsen}(N_2 / N_1)$$

Bajo estas condiciones se genera una forma de onda electromagnética conocida como "onda evanescente". Como se muestra en la Figura 1B, el campo eléctrico asociado a la luz en el medio más denso forma una onda 18 sinusoidal permanente normal a la superficie de separación. La onda evanescente penetra en el medio 16 más raro, pero su energía E se disipa exponencialmente en función de la distancia Z desde la superficie de separación como se muestra en 20. Un parámetro conocido como "profundidad de penetración" (d_P - mostrado en la Figura 1A a 22) se define como la distancia desde la superficie de separación en la que la energía de la onda evanescente ha disminuido hasta 0,368 veces el valor de la energía en la superficie de separación. [Véase. Sutherland y col., J. Immunol. Meth., 74:253-265 (1984) que define dp como la profundidad en la que E= $(e^{-1}).E_0$. La profundidad de penetración se calcula del siguiente modo:

$$d_P = \frac{\lambda / N_1}{2\pi\left\{\text{sen}^2\theta_R - (N_2 / N_1)^2\right\}^{1/2}}$$

Los factores que tienden a aumentar la profundidad de penetración son: aumento del ángulo de incidencia, θ_R; índices de refracción estrechamente igualados de los dos medios (es decir, N_2/N_1 -> 1); y aumento de la longitud de onda, λ. Por ejemplo, si un elemento de TIR de cuarzo (N_1 = 1,46) se coloca en un medio acuoso (N_2 = 1,34), el ángulo crítico, θ_C, es 66° (= arcsen 0,9178). Si luz de 500 nm impacta contra la superficie de separación a θ_R = 70° (es decir, mayor que el ángulo crítico), la dp es aproximadamente 270 nm.

Dentro de la profundidad de penetración, la onda evanescente en el medio más raro (normalmente una disolución de reacción) puede excitar fluorescencia en la muestra. Este fenómeno se ha usado en la materia con respecto a inmunoensayos Harrick y col., Anal. Chem., 45:687 (1973). Los dispositivos y procedimientos que usan fluorescencia de TIR para inmunoensayos se han descrito en la materia por Hirschfield, patentes de EE.UU. 4.447.564, 4.577.109 y 4.654.532; Hirschfield y Block, patentes de EE.UU. nº 4.716.121 y 4.582.809 y documento de EE.UU. nº de serie 07/863.553 publicado como el documento WO 93/20240 (Abbott Labs), que se incorporan todos en este documento por referencia. Un agente inmunoespecífico se adhiere a la superficie del elemento y deja que reaccione con componentes de unión específica fluorescentemente marcados en el medio más raro. La unión específica hace que las marcas fluorescentes se unan dentro de la profundidad de penetración. La fluorescencia emitida (a la longitud de onda desplazada) hace un túnel en el elemento de TIR, se propaga dentro del elemento de TIR a lo largo de la misma trayectoria que la onda sinusoidal permanente (pero a una longitud de onda diferente) y se detecta a la salida del elemento.

La TIR también se ha usado conjuntamente con la detección de la difusión de la luz en una técnica denominada en lo sucesivo reflectancia interna total difundida ("STIR"). Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. 4.979.821 y 5.017.009 a Schutt y col. y el documento WO 94/00763 (Akzo N. V.). Según esta técnica, un haz de luz es barrido a través de la superficie de un elemento de TIR a un ángulo adecuado y la energía de la luz es totalmente reflejada, excepto la onda evanescente. Partículas tales como glóbulos rojos sanguíneos, oro coloidal o látex específicamente unidos dentro de la profundidad de penetración difundirán la luz y la luz difundida se detecta por un medio de fotodetección. El documento WO 94/00763 también describe el barrido del haz de luz a través de varios sitios de miembros de unión específica que son tanto (1) el mismo miembro de unión a concentración variable para lograr un intervalo dinámico más ancho o (2) diferentes miembros de unión para probar diferentes analitos en una forma múltiplex. El barrido del haz de luz a través de múltiples sitios y la recogida de luz difundida en cada uno es un procedimiento que requiere mucho tiempo.

En la patente de EE.UU. 4.608.344 a Carter y col. una guía de ondas óptica se emplea como elemento de TIR. En una variación, múltiples sitios de unión están dispuestos sobre la guía de ondas en líneas o rejillas específicas para crear un patrón de rejilla de difracción de luz difundida. Mirando luego en sólo órdenes específicos de luz difundida, esta técnica minimiza la difusión producida por imperfecciones superficiales y/o impurezas tales como partículas de polvo (véanse la Fig. 14 y las columnas 17-19).

El uso práctico de los dispositivos de Carter y de STIR está muy limitado por la grave difusión de ruido de partículas en disolución. Este ruido limita la sensibilidad de detección de partículas unidas asociadas al analito. El escaso rendimiento se compensó con la sofisticada electrónica y óptica que podrían discriminar la pequeña cantidad de señal con respecto a los altos niveles de ruido. La complejidad electrónica y óptica produce sistemas muy caros.

Finalmente, la patente de EE.UU. 5.192.502 a Attridge y col. enseña un dispositivo que comprende placas paralelas que definen una cavidad para recibir un fluido de muestra. Una placa sirve de guía de ondas y la otra está recubierta de una capa de un material absorbente de la luz.

Otra técnica anterior de interés incluye la divulgación de Drmanac y col., patente de EE.UU. 5.202.231, que describe una nueva técnica para la generación de información de secuencias de ácidos nucleicos conocida como secuenciación por hibridación (SBH). Según esta técnica, una fase sólida que contiene unida a la misma una matriz de oligonucleótidos de secuencia conocida se deja hibridar con ADN marcado de una muestra. Por tanto, un único experimento de hibridación permite el examen de un gran número de sitios diferentes sobre una molécula de ADN. El diagnóstico de varias afecciones genéticas humanas tales como distrofia muscular de Duchenne o fibrosis quística probablemente requerirá el poder de resolución de un sistema del tipo SBH para determinar la mutación asociada al estado de enfermedad de un modo preciso y económico. Una implementación particular del procedimiento de SBH usa un gran número de oligonucleótidos inmovilizados en una matriz bidimensional de alta densidad. Un dispositivo tal se ha llamado un “chip de ADN” análogo a los circuitos de alta densidad producidos por la industria electrónica. Una muestra de ADN desconocido se aplica al chip y el patrón de hibridación se determina y se analiza para obtener información de las secuencias. Los documentos WO 92/10588 y WO 92/10092 (Affymax Technologies N.V.) contienen divulgaciones similares, además de un procedimiento fotolitográfico para fabricar tales chips.

Como las condiciones de rigurosidad afectan a la hibridación, la perfecta diferenciación y la especificidad pueden obtenerse si la rigurosidad puede controlarse con exactitud. Por tanto, las curvas de fusión podrían proporcionar una dimensión adicional al sistema de chip de ADN y permitir una mejor diferenciación de secuencias estrechamente relacionadas, una preocupación en la implementación de tecnología de SBH. La capacidad para cambiar la temperatura y monitorizar en tiempo real los patrones de hibridación del chip sería de gran utilidad, particularmente cuando hay una gran variación en el contenido de GC. Livshits y col. J. Biomol. Struct. & Dynamics, 11:783-795 (1994) describen una técnica de secuenciación de ADN en la que la discriminación de hibridaciones perfectas e imperfectas fue posible en un sistema de ADN inmovilizado en gel usando marcas radiactivas o fluorescentes. El gel se sometió a lavados de un minuto cada 5ºC para eliminar la marca asociada a ADN hibridado de manera imperfecta. Los autores reivindican que el gel fue ventajoso debido a una mayor capacidad de inmovilización y mayor poder de discriminación que otras superficies. Sin embargo, la necesidad de lavar la marca en exceso de la superficie, además del tiempo relativamente largo para barrer toda la superficie para obtener una medición, imponen significativas limitaciones. Por ejemplo, si se requiere un minuto para leer una matriz de chip de ADN completo y se necesita un lavado de un minuto en cada incremento de temperatura, entonces una curva de fusión de alta resolución (por ejemplo cada 1ºC) de 30 a 70ºC requeriría una hora. La temperatura tendría que mantenerse constante durante un minuto en cada incremento de temperatura hasta que se midieran todos los puntos en el chip.

Por tanto, es de interés la divulgación de la solicitud de EE.UU. en tramitación junto con la presente de copropiedad nº de serie 08/140.383 presentada el 21 de octubre de 1993 y titulada APARATO Y PROCEDIMIENTO PARA DETECTAR UN LIGANDO DIANA, incorporada en este documento por referencia. La presente solicitud describe el uso de una cámara de dispositivo de carga acoplada “CCD” y software de manipulación de imágenes para obtener imágenes y detectar ligandos diana de unión específica dispuestos en múltiples sitios espacialmente separados sobre una única fase sólida.

El documento WO 94/00763 desvela el uso de guía de ondas para la determinación de la concentración de una especie (o analito) en disolución en un líquido midiendo la tasa (concentración dependiente para su combinación con o disociación de un reactivo específico para el mismo, por ejemplo, un resto de conjugado en una reacción de complejación. Se desvela un procedimiento de detección de uno o más miembros de pares de unión en una muestra que comprende las etapas de: (a) inmovilizar al menos dos primeros miembros de pares de unión que son tanto iguales como diferentes sobre una superficie reactiva de un medio ópticamente transparente que tiene un índice de refracción superior al índice de refracción de la muestra, de forma que cada miembro de pares de unión inmovilizados está separado del otro, proporcionando así al menos dos primeros miembros de pares de unión inmovilizados espacialmente separados; (b) poner en contacto los primeros miembros inmovilizados con la muestra y al menos un segundo miembro de pares de unión marcado difusor de la luz; (c) iluminar cualquier complejo difusor de la luz inmovilizado formado en la etapa (b) con una onda evanescente derivada de la reflectancia interna total de luz incidente propagada en el medio ópticamente transparente; y (d) detectar por separado luz difundida por cada complejo difusor de la luz inmovilizado. El procedimiento requiere un sistema de barrido por láser y una iluminación

bien definida.

El documento EP-A-0 075 353 desvela un procedimiento de detección de uno o más analitos en una muestra mediante la metodología basada en la luz, especialmente la de la espectroscopía de reflectancia interna total difundida o reflectancia, usando una única superficie reactiva multifuncional. Se desvela un procedimiento para la determinación de especies en disolución con una guía de ondas óptica.

Resumen de la invención

Un reto afrontado por el Proyecto Genoma Humano en secuenciar completamente el genoma humano es aumentar dos órdenes de magnitud la tasa de adquisición de datos de secuencias de ADN. La presente solicitud describe como una realización preferida un procedimiento de detección que usa una guía de ondas óptica bidimensional que permite la medición de la unión en tiempo real o la fusión de una marca de difusión de la luz en múltiples sitios de captura sobre un soporte que comprende una matriz de ADN. Esto permite la recogida de datos de hibridación tan rápidamente como lo permite la grabación de vídeo. Los procedimientos se basan en la difusión de la onda evanescente, por lo que sólo la marca confinada dentro de la profundidad de penetración genera señal. La obtención de imágenes de la luz difundida permite el interrogatorio de toda la matriz simultáneamente. La especificidad de hibridación es equivalente a la obtenida con un sistema convencional y autorradiografía. Las curvas de fusión están de acuerdo con las curvas de fusión en fase líquida para las mismas combinaciones de secuencias, y diferencias de tan sólo un único par de bases son fácilmente distinguibles. La dilución limitante estableció la detección de dianas a concentraciones de tan sólo aproximadamente 0,4 nM, que es comparable a los mejores sistemas basados en fluorescencia actuales. Se anticipa que esta metodología proporcionará una poderosa herramienta para la detección rápida y económica de variaciones de secuencias.

Una aplicación particularmente útil para la invención es los estudios de fusión de oligonucleótidos en tiempo real. Por consiguiente, la invención se refiere a un procedimiento para determinar la secuencia de nucleótidos de segmento de ácido nucleico desconocido o para distinguir dos secuencias de nucleótidos estrechamente relacionadas, comprendiendo el procedimiento:

(a) proporcionar un dispositivo de guía de ondas, comprendiendo el dispositivo de guía de ondas (i) un elemento transparente que tiene un índice de refracción superior al de la muestra de fluido; (ii) un borde receptor de la luz; y (iii) una superficie reactiva que comprende una pluralidad de sitios que tienen oligonucleótido inmovilizado sobre la misma, definiendo dichos sitios una matriz de oligonucleótidos que tiene diferentes secuencias para hibridarse con el ácido nucleico desconocido, no teniendo otras porciones de no sitio de la superficie de dicho elemento oligonucleótidos inmovilizados sobres la mismas;

(b) poner en contacto la superficie reactiva bajo condiciones de hibridación con dicho ácido nucleico desconocido en el que dicho ácido nucleico desconocido, tanto directamente como mediante pares de unión análogos intermedios si se desea, está marcado con una marca difusora de la luz; formándose así complejos de marca difusora de la luz unidos a aquellos sitios de la superficie reactiva que son complementarios a la secuencia del ácido nucleico desconocido;

(c) iluminar el borde receptor de la luz de la guía de ondas con luz eficaz para crear reflexión interna total dentro de la guía de ondas, iluminándose así simultáneamente toda la superficie reactiva;

(d) recoger sustancialmente simultáneamente la luz difundida, si la hay, de cada sitio y de porciones de no sitio de dicha superficie;

(e) comparar el grado de difusión de la luz en cada sitio con tanto (i) el grado de difusión de la luz en una porción de no sitio; como (ii) el grado de difusión de la luz en otro sitio; y

(f) que comprende además aumentar incrementalmente las condiciones de rigurosidad en la superficie reactiva del dispositivo de guía de ondas parar iniciar la disociación de ácido nucleico unido de los sitios y repetir las etapas (d) y (e) en cada incremento;

por lo que diferencias de un único par de bases entre los oligonucleótidos y el ácido nucleico desconocido pueden distinguirse de apareamientos perfectos por diferencias en las propiedades de disociación.

El analito de unión específica puede ser un oligonucleótido o ácido nucleico. También puede ser un antígeno o anticuerpo en la mayoría de los aspectos. Mientras que todos los aspectos tienen preferentemente múltiples sitios, ciertos aspectos no requieren esto. Varios “múltiples” o “pluralidad” de sitios pueden ser de tan sólo dos o hasta varios miles.

El elemento de guía de ondas puede comprender una superficie plana tal como una placa de vidrio. Es posible proporcionar una segunda placa que está fijada al elemento para formar entremedias un canal capilar. La superficie de reacción estará orientada hacia el canal de manera que el canal pueda usarse como recipiente de reacción para hacer fluir reactivos sobre la superficie reactiva. Por tanto, se prefiere recubrir la superficie con una proteína metasoluble tal como caseína. Este recubrimiento sirve para bloquear los sitios de unión no específica y para facilitar el flujo de líquidos sobre la superficie.

La marca difusora de la luz (LSL) en todos los casos puede ser partículas coloidales tales como oro coloidal o selenio o diminutas partículas de látex. También es posible en todas las realizaciones utilizar un miembro de absorción de líquido (LAM) en la disolución sobre la superficie de reacción. Esto tiene la ventaja de reducir la difusión de fondo muy próxima a su fuente. El LAM aumentó la D.O. de la disolución a al menos 15 y proporciona un fondo oscuro contra el que la difusión en los sitios se muestra como un área brillante.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 ilustra los principios de la reflectancia interna total ("TIR") como se conoce en la técnica y se describe en más detalle en la sección de antecedentes. A la izquierda, la Figura 1 muestra la reflexión de la luz en una superficie de separación y a la derecha una representación de la energía del campo eléctrico E en función de la distancia Z desde la superficie de separación.

Las Figuras 2A, 2B y 2C son, respectivamente, vistas en perspectiva, lateral y en sección transversal de un dispositivo según una realización de la invención. La Figura 2C es una sección transversal a escala ampliada tomada a lo largo de la línea C-C de la Figura 2B.

La Figura 3 es una representación en diagrama de una realización de la invención en la que un oligonucleótido se inmoviliza sobre la superficie de la guía de ondas y, dentro de la profundidad de penetración de la onda evanescente, captura un oligonucleótido complementario que lleva un resto de biotina al que está unido una partícula difusora de la luz de selenio coloidal.

Las Figuras 4-7, 8A y 9-12 son representaciones impresas de las imágenes de vídeo reales tomadas de las guías de ondas como se describe en más detalle en los ejemplos. Las imágenes de vídeo se introdujeron a un digitalizador de imágenes de 8 bits que digitalizó la información. El archivo digitalizado se importó en una aplicación de dibujos de la que se imprimió en una impresora de alta resolución.

Las Figuras 8B y 8C son curvas de disociación o de fusión de ADN. En cada temperatura se representan los datos de intensidad media generados en el Ejemplo 5 para esa temperatura.

Descripción detallada de la invención

Los diversos aspectos de la presente invención se describirán ahora en más detalle.

Elementos de TIR y dispositivos de guía de ondas

Los principios físicos de la reflexión interna total ("TIR") y las ondas evanescentes se exponen en la sección de antecedentes. Como se usa en este documento, "elemento de TIR" se refiere a cualquier material transparente que proporciona una superficie de separación capaz de reflexión interna total. El elemento puede ser, por ejemplo, una cubeta, una varilla o una placa. La onda evanescente de un elemento de TIR puede existir sólo en el punto o los puntos de reflexión interna total. A diferencia, una "guía de ondas" se refiere a un elemento de TIR bidimensional de forma que la luz es totalmente internamente reflejada en múltiples puntos, creando así una onda evanescente que es sustancialmente uniforme a través de toda o casi toda la superficie. Una guía de ondas bidimensional puede ser de configuración plana o curvilínea. Por simplicidad, como realización preferida se describe una guía de ondas plana.

En una realización preferida de la presente invención, el elemento de TIR es una guía de ondas bidimensional. Las Figuras 2A-2C ilustran una realización preferida en la que un dispositivo 30 de guía de ondas comprende un elemento 32 de guía de ondas plano y una placa 34 plana paralela. Por tanto, el elemento de guía de ondas tiene superficies 36 y 38 paralelas, además de un borde 40 receptor de la luz. Similarmente, la placa 34 tiene superficies 42 y 44 paralelas. El elemento 32 de guía de ondas y la placa 34 se mantienen juntos en un modo paralelo separado de forma que la superficie 38 del elemento y la superficie 42 de la placa definen un estrecho canal 46. El elemento y la placa pueden mantenerse juntos por cualquier medio conveniente que incluye medio 48 adhesivo que consiste en cinta adhesiva de doble cara dispuesta a lo largo de los bordes del elemento y la placa. El canal 46 es preferentemente más bien pequeño de manera que permita la transferencia capilar de una muestra de fluido a su través. Por ejemplo, la altura debe ser inferior a aproximadamente 1 mm, preferentemente inferior a aproximadamente 0,1 mm.

El elemento 32 deberá estar hecho de un material ópticamente transparente tal como vidrio, cuarzo, plásticos tales como policarbonato, acrílico o poliestireno. El índice de refracción de la guía de ondas deberá ser mayor que el índice de refracción del fluido de muestra como se conoce en la técnica para efectuar la reflectancia interna total. Para una disolución de muestra acuosa, el índice de refracción, n, es aproximadamente 1,33, por lo que la guía de ondas normalmente tiene un índice de refracción superior a 1,35, normalmente aproximadamente 1,5 o más. La guía de ondas puede ser un trozo de plástico o vidrio, por ejemplo, puede usarse un portaobjetos o cubreobjetos de microscopio de vidrio estándar.

La placa 34 puede construirse de materiales similares. Como se observa en las Figuras 2A y 2B, el extremo 40 receptor de la luz del elemento 32 de guía de ondas está dispuesto en una estrecha rendija 50 de una máscara 52 con el fin de minimizar los efectos de la luz parásita que se origina a partir de la fuente 54 de luz. La minimización de la luz parásita también se mejora usando materiales absorbentes de la luz como se trata más adelante.

La fuente 54 de luz para generar el haz de luz incidente puede ser casi cualquier fuente de energía electromagnética que incluya energía en los espectros visible, ultravioleta e IR próximo. Por tanto, el término “luz” se interpreta muy ampliamente y no está confinado al intervalo visible, excepto en las realizaciones que son visualmente detectadas. Las longitudes de onda no visibles se detectan por detectores optimizados para la longitud de onda particular como es muy conocido en la técnica. La luz puede ser monocromática o policromática, colimada o sin colimar, polarizada o sin polarizar. Las fuentes de luz preferidas incluyen láseres, diodos emisores de luz, lámparas de destello, lámparas de arco, lámparas incandescentes y lámparas de descarga fluorescentes. La fuente de luz usada para iluminar el elemento de guía de ondas puede ser un láser de helio-neón de bajo vataje. Para un desechable portátil tal como el descrito en el Ejemplo 1 más adelante, la fuente de luz puede ser una bombilla incandescente pequeña alimentada por una batería tal como se usa en lámparas de bolsillo. Preferentemente, la fuente de luz incluye medios potenciométricos para variar la intensidad de la fuente de luz. Alternativamente pueden emplearse filtros y/o lentes para ajustar la intensidad a un nivel adecuado.

Los medios de detección para determinar el grado de difusión de la luz se describen en detalle más adelante, pero brevemente comprenden medios tanto instrumentales como visuales. Una característica importante de la invención es que los acontecimientos de difusión de la luz a través de toda la guía de ondas pueden monitorizarse esencialmente simultáneamente, tanto por el ojo y el cerebro de un observador como por dispositivos de fotodetección que incluyen cámaras de CCD que forman imágenes que son digitalizadas y procesadas usando ordenadores. En cada caso sólo se usa una única superficie reactiva multifuncional y se ilumina simultáneamente por la onda evanescente.

Superficies reactivas

Según la invención, una superficie reactiva que consiste en al menos un sitio se forma sobre un lado del elemento de guía de ondas. Mientras que algunas realizaciones pueden sólo tener un único sitio de prueba, la invención utiliza mejor una pluralidad de tales sitios, y dispositivos de múltiples sitios se describirán en este documento. Los múltiples sitios de prueba pueden contener los mismos miembros de unión específica o diferentes. Un “sitio” (plural = “sitios” en este documento) se define como el área delimitada en la que se inmoviliza un miembro de unión específica para un analito, entendiéndose que fuera del área delimitada también existen porciones de no sitio de la superficie. El miembro de unión específica inmovilizado se denomina en este documento un “miembro de captura” o “SBM de captura”. Preferentemente, el sitio es un punto pequeño y las porciones de no sitio rodean el sitio. Por supuesto, son posibles muchos otros tamaños y configuraciones de sitios y están dentro de la invención. Un sitio también puede configurarse como una línea o barra; como una letra o número; como un círculo, rectángulo o triángulo; o como cualquier otra gráfico tal como, por ejemplo, cualquier gráfico normalmente empleado en colecciones de iconos informáticos o de imágenes prediseñadas.

El área (tamaño) de un sitio sólo necesita ser suficientemente grande para inmovilizar suficiente miembro de unión específica para permitir la captura del analito marcado y la partícula difusora de la luz. Esto depende en parte de la densidad del sitio, como se trata más adelante. Por ejemplo, se han usado satisfactoriamente áreas de sitios de tan sólo 150 μm de diámetro (véanse el Ejemplo 7 y la Figura 10). Tales áreas pequeñas se prefieren cuando sobre una superficie reactiva se colocan muchos sitios, dando una alta “densidad de sitios”. El límite inferior práctico de tamaño es aproximadamente 1 μm de diámetro. Para la detección visual se desean áreas suficientemente grandes para ser detectadas sin aumento; por ejemplo, al menos aproximadamente 1 a aproximadamente 50 mm^2; hasta 1 cm^2 o incluso más grandes. No hay límite de tamaño superior, excepto como lo dicten los costes de fabricación y la conveniencia del usuario; es adecuado cualquier tamaño deseado o forma de sitios.

Los dispositivos de múltiples sitios pueden contener los mismos SBM o diferentes en cada sitio. Si son iguales, la pluralidad de sitios puede tener concentraciones similares y así ofrecer información por duplicado o puede tener concentraciones variables del SBM, ofreciendo así semicuantificación o calibrado frente a un patrón. Si los SBM son diferentes, el dispositivo puede utilizarse para detecciones múltiplex de varios analitos simultáneamente. En un caso especial de diferentes SBM, uno o más sitios pueden servir de control positivo. Por supuesto, las combinaciones de todo lo anterior (por ejemplo, determinaciones semicuantitativas multiplexadas) son posibles en dispositivos con muchos sitios.

Para dispositivos de múltiples sitios, los sitios pueden disponerse en cualquier patrón o matriz conveniente. La separación entre sitios dependerá de la resolución del sistema de detección descrito más adelante y del procedimiento de fabricación usado para crear el sitio. Sujeto a la capacidad de fabricación, cuanto mayor sea la resolución de detección, más próximos pueden estar los sitios. Deberá haber suficiente separación de los SBM de captura inmovilizados de forma que la reacción de cada uno de estos miembros individualmente con el correspondiente miembro de unión en una muestra de fluido y/o un miembro marcado difusor de la luz pueda diferenciarse de una reacción en otro sitio sin interferencia sustancial debido a miembros de pares de unión cercanos inmovilizados y sus partículas difusora de la luz asociadas. Preferentemente, una porción de no sitio separa claramente todos y cada uno de los sitios. Una matriz muy simple es una malla cartesiana, pero también pueden configurarse múltiples sitios como líneas, patrones y otros gráficos. En superficies de reacción de múltiples sitios, uno o más sitios representarán frecuentemente un control positivo, un control negativo, una serie de patrones de calibrado o una combinación de cualquiera de estos.

Una configuración de sitio preferida es la forma de una cruz que produce un símbolo “más” en el caso de un resultado positivo. En una variación de esto, sólo la porción o porciones verticales de la cruz son sitio de unión a analito, mientras que el aspecto horizontal del más contiene un ligando específico para la marca que es independiente de la presencia de analito. Una configuración tal se describe en la patente de EE.UU. 5.008.080, “Dispositivo analítico en fase sólida y procedimiento de uso del mismo” a Brown y col. Las configuraciones de esta variación funcionan como una verificación del ensayo produciendo un símbolo menos “-” tanto si el analito está presente como si no, y produciendo un símbolo más “+” cuando el analito está presente. Además de la configuración de verificación “más/menos” también son posibles otras formas de esta variación como se desvelan en la patente citada.

En el dispositivo de dos planos de las Figuras 2A-2C, la superficie 60 reactiva se forma preferentemente sobre la superficie 38 del elemento 34 de guía de ondas que está orientado hacia el canal 48. Véase la Figura 2C. Esto facilita el poner en contacto la muestra y/o el reactivo de marca difusora de la luz con el sitio de la superficie reactiva permitiendo el flujo capilar a través de la superficie reactiva. El flujo puede potenciarse usando un material absorbente o secante tal como papel en un extremo del canal. Por supuesto, el dispositivo de dos planos es sólo una realización. También puede usarse un único elemento de guía de ondas bidimensional, estando la superficie de reacción recubierta en una cara. Sin embargo, puede necesitar estar orientado con la superficie de reacción en una dirección orientada hacia arriba para facilitar el contacto con la muestra y el reactivo de marca difusor de la luz. La difusión de la luz en la onda evanescente puede entonces observarse desde la parte inferior usando un espejo si se desea.

Miembros de unión específica e

Inmovilización sobre la superficie reactiva

En el procedimiento de la invención, uno o más miembros de captura se inmovilizan primero sobre la superficie de una guía de ondas óptica para formar una superficie reactiva. Un miembro de unión específica (“SBM”) es cualquier miembro de un par de unión análogo. Un “par de unión análogo” es cualquier combinación de ligando-receptor que se unirá específicamente al otro, generalmente mediante interacciones no covalentes tales como atracciones iónicas, enlace de hidrógeno, fuerzas de van der Waals, interacciones hidrófobas y similares. Pares análogos e interacciones a modo de ejemplo son muy conocidos en la técnica e incluyen, a modo de ejemplo y no de limitación: interacciones inmunológicas entre un anticuerpo o fragmento Fab y su antígeno, hapteno o epítope; interacciones bioquímicas entre una proteína (por ejemplo, hormona o enzima) y su receptor (por ejemplo, avidina o estreptavidina y biotina), o entre un hidrato de carbono y una lectina; interacciones químicas tales como entre un metal y un agente quelante; y apareamiento de bases de ácidos nucleicos entre hebras de ácidos nucleicos complementarios. Un miembro de unión específica recientemente informado es el análogo del ácido nucleico de péptido, o “PNA”, descrito en los documentos WO 92/20702 y WO 92/20703, ambos a Buchardt y col., y en Flam, Science. 262: 1647, (1993), que forma un par de unión análogo con ácidos nucleicos u otros PNA. Se entenderá que ácido nucleico incluye ácido 2'-desoxirribonucleico (ADN), además de ácido ribonucleico (ARN) cuando los permita la estabilidad.

La preparación de SBM de anticuerpo es una técnica antigua y muy conocida y no necesita describirse en detalle. Brevemente, un animal se inmuniza o se expone al hapteno deseado según un programa de inmunización. Frecuentemente, el hapteno se acopla a una molécula de vehículo tal como BSA para mejorar el reconocimiento. Después de un periodo de tiempo adecuado, el animal se sangra y se extraen los anticuerpos. Alternativamente, el anticuerpo puede obtenerse a partir de fluido ascítico. Si se desea pueden prepararse anticuerpos monoclonales altamente específicos usando las técnicas ahora convencionales de Kohler y Milstein, Nature, 256, 495 (1975). Los anticuerpos tienen numerosos grupos amino, carboxilo y sulfhidrilo que pueden utilizarse para reacciones de acoplamiento.

La síntesis de SBM de oligonucleótido también es pura rutina usando sintetizadores automatizados tales como ABI 480. Estos instrumentos preparan oligonucleótidos de prácticamente cualquier secuencia deseada de longitudes de hasta aproximadamente 75-100 bases. Si se desean polinucleótidos más largos pueden prepararse mediante técnicas de clonación conocidas o mediante síntesis de segmentos más cortos y ensamblaje. Si se desea, los oligonucleótidos pueden modificarse con aminas terminales u otros grupos reactivos para el acoplamiento. Una revisión algo anticuada pero todavía útil de químicas de acoplamiento se encuentra en Goodchild, Bioconjugate Chemistry, 1(3):165-187 (1990).

Los SBM pueden unirse covalentemente a la guía de ondas mediante medios de acoplamiento químicos conocidos en la técnica. La superficie reactiva puede derivatizarse directamente con una variedad de grupos químicamente reactivos que luego, bajo ciertas condiciones, forman enlaces covalentes estables con el SBM aplicado. Alternativamente, la superficie reactiva puede primero recubrirse con polímeros químicamente derivatizados tales como dextrano o PEG, que luego forman enlaces covalentes con los SBM aplicados. Ciertos tipos de detergentes también pueden recubrir la superficie reactiva, luego derivatizarse, *in situ*, y hacerse reaccionar con SBM. Por ejemplo, las guías de ondas de vidrio y cuarzo contienen grupos que pueden activarse para grupos hidroxilo y siloxi reactivos que pueden acoplarse a miembros de unión específica mediante ligadores. Tales ligadores incluyen, por ejemplo, ligadores homo y heterobifuncionales conocidos.

Por supuesto, es preferible ligar SBM a la superficie reactiva en un modo tal que no se pierdan las propiedades de unión específica del miembro de unión. Por ejemplo, los anticuerpos pueden acoplarse mediante su porción Fc como se enseña en la patente de EE.UU. 5.191.066 (Bieniarz y col.); y los oligonucleótidos pueden acoplarse mediante aminas terminales u otros grupos funcionales. Los brazos de ligadores como se enseñan por la patente de EE.UU. 4.948.882 a Ruth pueden colocarse en posiciones "estéricamente tolerantes" de restos de bases para facilitar el acoplamiento a fases sólidas sin pérdida de las capacidades de hibridación. En todavía otro procedimiento, la superficie reactiva puede recubrirse con estreptavidina mediante adsorción física, luego hacerse reaccionar con un miembro de pares de unión marcado con biotina para crear una superficie bien caracterizada biológicamente reactiva.

Más recientemente, el documento WO 92/10092 (Affymax Technologies, N. V.; Fodor y col.) describió un procedimiento de síntesis de oligonucleótidos directamente sobre un soporte sólido usando técnicas de fotolitografía.

Para sorpresa de los solicitantes, los SBM de captura no necesitan estar covalentemente unidos a la superficie reactiva. Los SBM pueden adsorberse o complejarse sobre la superficie usando capas de recubrimiento de proteínas. La observación de que las diversas fuerzas no covalentes que mantienen el SBM de captura (por ejemplo, ADN) y el SBM de marca (por ejemplo, anticuerpo) en su sitio son menos lábiles que las fuerzas de hibridación de ADN fue algo sorprendente. Sin embargo, esto es debido en parte a la fortuita elección de condiciones, concretamente fuerza iónica que permite temperaturas de fusión de ADN relativamente bajas (véanse los ejemplos). Puede ser posible aumentar la temperatura de fusión (aumentando la fuerza iónica) hasta un punto en el que el dúplex de ADN ya no sea el enlace débil en la cadena.

La densidad (cantidad por unida de área) de SBM de captura sobre la superficie reactiva establece una correlación positiva con la sensibilidad del sistema. Usando SBM de oligonucleótido pueden lograrse aproximadamente 5000 moléculas de ADN por µm cuadrado mediante los procedimientos de puntos descritos en este documento. Otros procedimientos de construcción de chips, por ejemplo, las técnicas de fotolitografía mencionadas anteriormente, pueden proporcionar otras densidades. La densidad máxima teórica estimada para el SBM de ácido nucleico es aproximadamente 250.000 moléculas por µm cuadrado. Sin embargo, es poco probable que puedan conseguirse chips de esta densidad o que proporcionen un rendimiento óptimo en vista de las restricciones estéricas impuestas. La densidad óptima para la mejor sensibilidad implica un equilibrio entre maximizar el número de sitios de unión por unidad de área y maximizar el acceso a tales sitios teniendo en cuenta los requisitos de la cinética de difusión y las consideraciones estéricas.

La aplicación del SBM de captura sobre la superficie reactiva puede llevarse a cabo por cualquier medio conveniente. Por ejemplo, puede usarse convenientemente el uso manual de micropipetas o tubos microcapilares para poner puntos de miembro de captura sobre la superficie reactiva. Sin embargo, por comodidad, reproducibilidad y ahorro de costes se prefiere usar automatizado este procedimiento. La aplicación mecanizada es particularmente deseable cuando el ensayo se usa en pruebas a gran escala tales como aplicaciones de cribado rutinarias. Los procedimientos de aplicación automatizados incluyen, por ejemplo, bombas de desplazamiento positivo, tablas de posición X-Y y/o sistemas de pulverización o impresión de chorro de tinta y similares.

Cuando sea apropiado, los SBM pueden ponerse primero en una disolución para facilitar el procedimiento de deposición de las muestras sobre la superficie reactiva. Disoluciones adecuadas para este fin sólo tienen el requisito general que, tras el secado, el SBM retiene sustancialmente su especificidad (es decir, sus propiedades de unión específica) y no interfiere significativamente con las propiedades de refracción del elemento. El volumen de disolución que va a depositarse depende de la concentración de SBM en la disolución. Idealmente, las disoluciones se preparan en un intervalo de concentración de aproximadamente 0,5 a 500 µM de manera que una pequeña gota (aprox. 2 µl) contenga la cantidad deseada de SBM. Normalmente se prefieren aplicaciones repetidas de SBM a menores concentraciones para no desperdiciar el SBM. Esto se repite hasta que esté presente suficiente SBM, teniendo cuidado de no solapar la aplicación en sitios próximos. Si se desea puede incluirse un agente de reticulación para aumentar la cantidad de SBM en el sitio de captura, siempre que el agente de reticulación no interfiera con las propiedades de unión específica.

Después de depositarse el SBM sobre uno o más sitios de la superficie reactiva, el miembro se deja secar y así se inmoviliza sobre la superficie reactiva. La evaporación es el procedimiento de secado preferido y puede realizarse a temperatura ambiente (aproximadamente 25ºC). Si se desea, la evaporación puede realizarse a temperatura elevada, mientras que la temperatura no inhiba significativamente la capacidad de los miembros de captura para interactuar específicamente con sus miembros de pares de unión correspondientes. Por ejemplo, si el SBM de captura inmovilizado es una proteína deberán emplearse temperaturas no desnaturalizantes.

Además de la inmovilización del SBM de captura a la superficie reactiva, la superficie reactiva se trata preferentemente para bloquear interacciones no específicas entre la superficie reactiva y los miembros de unión a analito en una muestra de fluido que va a probarse. En el caso de un SBM de proteína (por ejemplo, antígeno, anticuerpo o PNA) sobre la superficie reactiva, el material de bloqueo debe aplicarse después de la inmovilización del SBM. Los materiales de bloqueo de proteínas adecuados son caseína, zeína y albúmina de suero bovino (BSA). Otros bloqueadores pueden ser detergentes y polímeros solubles en agua de cadena larga. El material de bloqueo puede aplicarse convenientemente a la superficie reactiva como una disolución acuosa o acuosa tamponada. La disolución de bloqueo puede aplicarse a la superficie reactiva en cualquier momento después de inmovilizarse los

primeros SBM de captura. En el caso de un SBM de ácido nucleico, el material de bloqueo puede aplicarse antes o después de la inmovilización del SBM. Los bloqueadores adecuados incluyen aquellos descritos anteriormente, además de dodecilsulfato de sodio al 0,5% (SDS) y 1x a 5x disolución de Denhardt (1x Denhardt es (Ficoll al 0,02%, polivinilpirrolidona al 0,02% y 0,2 mg/ml de BSA).

Se ha encontrado que la caseína es un material de bloqueo preferido para tanto ADN como SBM de anticuerpo y está disponible de Sigma Chemical, St Louis, MO, (nº de catálogo C-3400). La caseína pertenece a una clase de proteínas conocidas como proteínas "metasolubles" (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. 5.120.643 a Ching y col. incorporada en este documento por referencia) que requieren tratamiento químico para hacerlas más solubles. Tales tratamientos incluyen tratamiento ácido o alcalino y se cree que se realiza la escisión e/o hidrólisis parcial de la proteína intacta. Otras proteínas metasolubles incluyen zeína (nº de catálogo de Sigma Z-3625) y una proteína de la clara de huevo distinta de albúmina (nº de catálogo de Sigma A-5253). La caseína es una proteína de la leche que tiene un peso molecular de aproximadamente 23.600 (beta-caseína bovina), pero como se usa en este documento, la "caseína" o la caseína "tratada alcalina" se refieren ambas a una mezcla parcialmente hidrolizada que resulta del tratamiento alcalino como se describe en el Ejemplo 1 de la patente de EE.UU. 5.120.643. Un gel de electroforesis (poliacrilamida al 20% en TBE) de la caseína así tratada muestra una mezcla de fragmentos que tiene predominantemente un peso molecular inferior a 15.000 como se muestra por una banda difusa debajo de este marcador.

Es posible que los bloqueadores, particularmente la caseína, confieran una naturaleza hidrófoba a la superficie que facilite la acción de "extensión" descrita en los ejemplos. La "extensión" se produce cuando el agua aplicada a la superficie puede fundir el elemento en una gota cohesiva en vez de en múltiples gotitas pequeñas. Sin embargo, se cree que la uniformidad del recubrimiento es más importante que su hidrofobia. Los elementos que se forman en dispositivos de canal como en el Ejemplo 1 presentan preferentemente tal acción de extensión. Se cree que esto facilita el flujo y la difusión dentro del canal.

Debe entenderse que el primer miembro de unión específica puede ser específico para el analito mediante el intermediario de pares análogos adicionales si se desea. Por ejemplo, un SBM de oligonucleótido podría biotinilarse y unirse a la superficie reactiva mediante un par de unión análogo de biotina-avidina. Una unión tal se describe por Hansen en el documento EP 0 139 489 (Ortho). Similarmente, un oligonucleótido podría unirse a la superficie reactiva mediante una sonda mediadora como se desvela por Stabinsky en la patente de EE.UU. 4.751.177 (Amgen). Si se usan pares de unión análogos intermedios, debe tenerse en cuenta que la distancia total desde la superficie de separación (en la superficie reactiva) hasta la marca difusora de la luz no debe superar enormemente la profundidad de penetración. A este respecto se ha estimado que el diámetro de un anticuerpo de inmunoglobulina tiene aproximadamente 5 nm y que la longitud del ADN 20-mero (en forma de hélice β) tiene aproximadamente 6,8 nm. Esto deja lugar a múltiples pares análogos en una profundidad de penetración típica de 200-300 nm (véanse los antecedentes). También debe entenderse que las interacciones de unión análogas deberán resistir a las posteriores condiciones de reacción que, para algunas aplicaciones, pueden incluir temperaturas elevadas. Los oligonucleótidos más largos o aquellos con mayor contenido de GC son más estables y se prefieren en este caso.

Marcas difusoras de la luz

Otro componente importante de la presente invención es la marca difusora de la luz o partícula ("LSL"). Una LSL es una molécula o un material, frecuentemente una partícula, que hace que la luz incidente se difunda elásticamente, es decir, sin absorber sustancialmente la energía de la luz. LSL a modo de ejemplo incluyen marcas metálicas coloidales y no metálicas tales como oro o selenio coloidal; glóbulos rojos sanguíneos; y partículas de plástico teñidas hechas de látex, poliestireno, poli(acrilato de metilo), policarbonato o materiales similares. El tamaño de tales marcas particuladas oscila de 10 nm a 10 µm, normalmente de 50 a 500 nm, y preferentemente de 70 a 200 nm. Cuanto mayor sea la partícula, mayor será el efecto de difusión de la luz, pero esto es cierto de tanto partículas unidas como en disolución en masa, por lo que el ruido también aumenta con el tamaño de partícula. Las LSL de partículas adecuadas están disponibles de Bangs Laboratories, Inc., Carmel, IN, EE.UU.

En la presente invención, la LSL está unida al primer miembro de unión específica de un segundo par de unión análogo. El segundo miembro de pares de unión específica puede denominarse en lo sucesivo una "marca de SBM" y el complejo de LSL y SBM de marca se denomina en lo sucesivo "conjugado de marca" o sólo "conjugado". La naturaleza y la especificidad del SBM de marca dependen de la forma del ensayo. Para una forma de ensayo competitivo, el SBM de marca es un análogo del analito y se une específicamente al SBM de captura en competición con el analito. Para una forma de ensayo de sándwich directo, el SBM de marca es específico para un segundo epítope sobre el analito. Esto permite que el analito se "emparede" entre el SBM de captura y el SBM de marca. En una forma de ensayo de sándwich indirecto, el SBM de marca es específico para un sitio o grupo indicador que está asociado al analito. Por ejemplo, una vez se captura un analito antigénico, un anticuerpo biotinilado puede usarse para "emparedar" el analito, y se usa el SBM de marca específico para biotina. Esta forma de sándwich indirecta también es útil para ácidos nucleicos. En este caso, el SBM de captura es un oligonucleótido complementario a la diana y la diana contiene una molécula indicadora de unión específica (por ejemplo, biotina o un hapteno, normalmente incorporado mediante un procedimiento de amplificación tal como LCR o PCR) y el SBM de marca se elige para ser específico para el grupo indicador.

Por supuesto, el SBM de marca puede ser específico para su componente respectivo (analito o primer SBM, dependiendo de la forma) mediante pares análogos intermedios como era el caso con el SBM de captura. Por ejemplo, si el analito es un oligonucleótido tal como un producto de amplificación que lleva un grupo indicador de hapteno, una forma de ensayo de sándwich podría incluir una LSL conjugada con anticuerpo dirigido contra el hapteno. Por tanto, el SBM de marca es específico para el analito mediante el par de unión análogo hapteno-antihapteno. Un ejemplo de un par análogo intermedio de ácidos nucleicos se describe en Schneider y col., documento US 4.882.269 (Universidad de Princeton). Deberán considerarse las mismas consideraciones de distancia desde la superficie de separación y la estabilidad de los pares análogos para el SBM de marca, además del SBM de captura.

Independientemente de la forma del ensayo, el SBM de marca debe unirse a la marca difusora de la luz para formar el conjugado. Al igual que con el SBM de captura, el SBM de marca puede unirse covalentemente a la LSL, pero esto no es esencial. También es adecuada la adsorción física del SBM de marca sobre LSL particuladas. En tal caso, la unión sólo necesita ser suficientemente fuerte para soportar las posteriores condiciones de reacción sin pérdida sustancial de LSL, por ejemplo, de etapas de lavado u otro flujo de fluido.

En la bibliografía existe un gran número de estrategias de unión covalente adecuadas para acoplar la LSL y el SBM de marca. Por ejemplo, un grupo amino puede introducirse en un SBM de marca mediante químicas de síntesis convencionales (tales como están disponibles de Genosys Biotechnologies, Inc. The Woodlands, TX, EE.UU). Las químicas para activar una LSL para el acoplamiento covalente a un SBM modificado con amina incluyen, pero no se limitan a, bromuro de cianógeno, N-hidroxisuccinimida o carbodiimida. AFFINITY CHROMATOGRAPHY de W. H. Scouten, 1981, John Wiley & Sons, y SOLID PHASE BIOCHEMISTRY, ANALYTICAL AND SYNTHETIC ASPECTS de W.H. Scouten, 1983, John Wiley & Sons, describen tales técnicas de activación. En algunos casos, por ejemplo N-hidroxisuccinimida y carbodiimida, la LSL debe contener grupos carboxilo superficiales; para la activación con bromuro de cianógeno, la LSL debe contener grupos hidroxilo superficiales. También pueden emplearse ligadores hetero y homobifuncionales muy conocidos en tales conjugaciones covalentes. Las partículas de LSL con los grupos químicos apropiados y el diámetro para uso como LSL pueden obtenerse a partir de varias fuentes comerciales (por ejemplo, Bangs Laboratories, Inc., Carmel, IN, EE.UU.). El acoplamiento covalente de LSL al SBM de marca puede proporcionar ventajas en sistemas en los que se requieren condiciones rigurosas para mejorar la especificidad de unión debido a que tales condiciones pueden interferir con la adsorción no covalente del SBM de marca a una LSL.

Materiales absorbentes de la luz

En un aspecto preferido de la invención, un material absorbente de la luz ("LAM") se añade a la mezcla de muestra y conjugado de marca. El LAM se diseña para evitar que la luz parásita interfiera en la reacción difusora de la luz. La luz parásita se produce principalmente a partir de imperfecciones microscópicas en la superficie de separación de reflexión y a partir de la difusión de la onda evanescente por partículas que migran a, pero que no están unidad en, la profundidad de penetración. El LAM, cuando se dispersa en la disolución en masa, absorbe y minimiza el efecto de tal luz parásita mejor que cuando un material tal está recubierto sobre una superficie para formar una capa opaca (como en la técnica anterior). El LAM deberá proporcionar una densidad óptica eficaz final ("D.O.") de al menos 15; preferentemente superior a 100; lo más preferentemente 300 o más. Una D.O. "eficaz" tiene en cuenta la longitud de onda de la luz incidente y es la D.O. a la longitud de onda de la luz monocromática y la D.O. a la longitud de onda más frecuente de la luz policromática.

Los LAM adecuados incluyen el propio conjugado, además de numerosos colorantes absorbentes de la luz. Los colorantes absorbentes de la luz son cualquier compuesto que absorba energía del espectro electromagnético, idealmente a longitud(es) de onda que se corresponde(n) con la(s) longitud(es) de onda de la fuente de luz. Como se conoce en la técnica, los colorantes consisten generalmente en estructuras heterocíclicas conjugadas ejemplificadas por las siguientes clases de colorantes: colorantes azoicos, colorantes diazoicos, colorantes de triazina, colorantes alimentarios o tintes biológicos. Colorantes específicos incluyen: Coomasie Brilliant Blue R-250 Dye (Biorad Labs, Richmond, CA); Reactive Red 2 (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO), azul de bromofenol (Sigma); xileno cianol (Sigma); y fenolftaleína (Sigma). The Sigma-Aldrich Handbook of Stains, Dyes and Indicators de Floyd J. Green publicado por Aldrich Chemical Company, Inc., (Milwaukee, WI) proporciona una gran cantidad de datos para otros colorantes. Con estos datos, los colorantes con las propiedades de absorción de la luz apropiadas pueden seleccionarse para coincidir con las longitudes de onda emitidas por la fuente de luz.

Preferentemente, estos LAM no interfieren con la absorción del SBM de marca sobre la LSL o con la especificidad del SBM de marca inmovilizado. Por ejemplo, si el SBM de marca es un péptido, polipéptido o proteína, el LAM preferentemente no desnaturaliza el péptido, polipéptido o proteína. Similarmente, si el SBM de marca es una secuencia de nucleótidos, el LAM preferentemente no desnaturaliza la secuencia de nucleótidos. Una vez seleccionados basándose en las propiedades de absorción de la luz, los colorantes pueden evaluarse empíricamente para garantizar que el colorante no interfiera con los acontecimientos de unión específica requeridos para la implementación del ensayo de guía de ondas.

Sorprendentemente, el propio conjugado también puede servir de LAM. Se ha encontrado que la detección también mejora usando concentraciones de conjugado de marca superiores a las necesarias, por ejemplo, concentraciones que proporcionan una D.O. eficaz de al menos 15, preferentemente superior a 300, lo más

preferentemente superior a 500. Los procedimientos de concentración de un conjugado incluyen purificación por afinidad o centrifugación como se describen en los Ejemplos 2 y 3. Aunque los colorantes pueden usarse conjuntamente con conjugado concentrado, se ha encontrado que altas concentraciones de conjugados solos son normalmente suficientes. Este fenómeno de añadir más marca para mejorar los niveles de señal con respecto al ruido es prácticamente insólito en ensayos de diagnóstico y es muy contrario al pensamiento actual.

Mientras que los LAM son una característica opcional de la invención, su uso produce la capacidad de usar mayores concentraciones de conjugado de marca, mayores intensidades de luz y mayores partículas de marca, todos los cuales mejoran enormemente la realización con respecto a sistemas que no contienen un material absorbente de la luz. El efecto potenciado de usar un LAM es supuestamente debido a la eliminación de luz parásita en un punto mucho más próximo a su fuente que cualquier procedimiento conocido de la técnica anterior. Los recubrimientos sobre la superficie de la guía de ondas contiguos a la superficie de reacción sólo pueden absorber la luz parásita que alcanza esta superficie. La luz parásita en la disolución todavía está libre para producir difusión no deseada.

Procedimientos de uso

Los procedimientos de ensayo según la invención emplean elementos de TIR o guías de ondas como se han descrito anteriormente e incluyen formas de ensayo competitivo y de sándwich directo o indirecto. Una forma de sándwich indirecto se representa en la Figura 3.

Primero, un elemento de TIR o guía 62 de ondas se prepara como se trata anteriormente, teniendo al menos un SBM de captura inmovilizado en uno o más sitios en la superficie reactiva en la superficie 64 de separación. El SBM de captura es específico para el analito. En la Figura 3, el SBM es un oligonucleótido de captura mostrado en 66, tiene la secuencia 5'-AGTGGAGGTCAACGA (SEC ID Nº 3) y está inmovilizado en la superficie 64 de separación. Preferentemente hay múltiples SBM inmovilizados en distintos sitios que están espacialmente separados por porciones de no sitio.

En una forma de sándwich, la muestra de fluido que va a probarse para la presencia o la cantidad de analito se pone entonces en contacto con el SBM de captura sobre la superficie reactiva. El único requisito general de esta etapa de procedimiento es que la muestra esté en contacto directo con los SBM inmovilizados espacialmente separados para efectuar la unión entre el analito y el SBM de captura. También se prefiere el mezclado suave de la muestra de fluido después de ponerla en contacto con la superficie reactiva en el procedimiento de la presente invención, pero no se requiere. Tal mezclado puede ayudar a garantizar el estrecho contacto entre la muestra de fluido y el SBM inmovilizado. En lugar de mezclar, un flujo capilar de fluido de muestra a través de la superficie reactiva también promueve el buen contacto y la unión del analito al SBM de captura.

A continuación, un conjugado de marca también se pone en contacto con la superficie reactiva bajo condiciones de unión. El conjugado de marca se une al analito (o a un grupo indicador unido al analito) para formar un complejo de unión específica difusor de la luz sobre o próximo a la superficie reactiva. En la forma de sándwich, la muestra y el conjugado pueden mezclarse opcionalmente antes de poner en contacto la superficie reactiva con cualquier componente o puede usarse el procedimiento de dos etapas descrito. Si se desea, los procedimientos pueden ponerse en práctica usando un LAM, que se añadiría al conjugado o a la mezcla de muestra-conjugado.

Con referencia a la Figura 3, el conjugado de marca consiste en la partícula 68 de selenio coloidal difusora de la luz en la que están inmovilizados anticuerpos 70 dirigidos contra biotina. El analito es el oligonucleótido mostrado en 72 5'-TCGTTGACCTCCACT (SEC ID Nº 12) que ha sido marcado con un grupo 74 indicador de biotina ("Bi"). La complementariedad de los oligonucleótidos y la especificidad del anticuerpo para biotina mantienen la LSL dentro de la profundidad 76 de penetración de la guía de ondas.

Se conocen numerosos procedimientos para incorporar un grupo indicador tal en el ácido nucleico de muestra. Por ejemplo, la muestra podría amplificarse usando una técnica tal como PCR o LCR en la que los cebadores pueden llevar el indicador. Alternativamente, los indicadores pueden acoplarse a trifosfatos de nucleótido individuales que luego se incorporan en productos de extensión preparados a partir de la muestra. Este procedimiento de incorporación a funcionará con PCR y también con la variación de LCR conocida como Gap LCR.

Entonces, el elemento se ilumina de un modo que se efectúe la reflexión interna total. Ya se han descrito las fuentes de luz y los principios físicos de TIR. En la Figura 3, la difusión de la onda evanescente se ilustra en 78. Preferentemente se usa una rendija para reducir la luz parásita. En los sitios en los que se han formado complejos de unión específica difusores de la luz, la difusión de la luz se observa como áreas más claras frente al fondo más oscuro de las porciones de no sitio (véanse, por ejemplo las Figuras 4-8A y 9-12). Cuanto más brillante parezca el sitio, más LSL está unida y más analito está presente en ese sitio. El procedimiento puede usarse para cuantificar o semicuantificar mediante lectura los tonos grises en un ordenador y, usando calibradores, estimar la cantidad de analito presente en cada sitio.

En una forma competitiva, el dispositivo de TIR y la superficie reactiva son como antes. Sin embargo, la LSL es un análogo de analito que compite con el analito de muestra por el SBM de captura. Por tanto, el brillo del punto está inversamente relacionado con la cantidad de analito. En esta forma, la muestra y el conjugado deben mezclarse antes de ponerse en contacto cualquiera de ellos con la superficie reactiva. Un LAM es útil en formas

competitivas, precisamente como en formas de sándwich.

Debe señalarse que no se observa que el fenómeno conocido de forma muy diversa como “borde de ataque” o “efecto de pantalla” sea un problema con la presente invención. Este fenómeno se observa en dispositivos de flujo cromatográficos en los que la unión de la marca en sitios en la dirección 3' es inferior a la unión en sitios en la dirección 5'. Este fenómeno se evita principalmente debido a que los factores que controlan la unión de LSL son predominantemente la difusión, no la cromatografía, aún cuando algunas realizaciones utilizan un canal de flujo.

Aunque es posible usar el dispositivo de la invención dirigiendo secuencialmente un haz de luz a sitios individuales y creando pequeños sitios de generación de ondas evanescentes como en la técnica anterior, decididamente es más preferido iluminar la guía de ondas entera de una vez, creando así energía de onda evanescente a través de toda la superficie reactiva. Esta iluminación simultánea de toda la superficie reactiva es lo que permite un examen simultáneo y la comparación de todos los sitios, y así permite una detección mucho más rápida de lo que era previamente posible. Una ventaja importante de los sistemas de la invención es que permiten observar la cinética de unión y/o de disociación en tiempo real y permiten el desarrollo de una señal visible en cuestión de segundos, por ejemplo, de 1 a 20 segundos, en la realización preferida. Toda la superficie reactiva de la guía de ondas puede observarse (y/o detectarse) de una vez y toda está iluminada simultáneamente, por lo que la acumulación de LSL en un sitio puede observarse en tiempo real ya que no se necesita barrer cada sitio tanto para la iluminación con luz incidente como para la detección de luz difundida.

Este hallazgo es algo sorprendente en vista de las enseñanzas anteriores con respecto a TIR. Normalmente, los detectores de elementos de TIR están situados a la salida del elemento con el fin de recoger la luz cuando sale del elemento. Siempre se ha asumido que la luz que sale del elemento estaba alterada por el acontecimiento de unión. De hecho, no serían posibles detecciones usando luz de salida sin una modificación de la luz tal por los acontecimientos de unión. Por tanto, se espera que la luz cambie de alguna forma por el acontecimiento de unión. En vista de esto no podría garantizarse que la luz se comportara de la misma forma tras encontrarse con un segundo sitio de unión y, por tanto, las enseñanzas disuaden de elementos de múltiples sitios simultáneamente iluminados por una fuente de luz común. La presente invención encuentra sorprendentemente que la luz internamente reflejada en un sitio en la dirección 3' (con referencia a la fuente de luz) no está interferida con los acontecimientos de unión en un sitio en la dirección 5'.

Además, el grado o la magnitud de la unión pueden monitorizarse en tiempo real a medida que cambian diversas condiciones. Por ejemplo, si los SBM son oligonucleótidos a los que se les permite formar apareamientos de cadenas y la condición cambiante es la rigurosidad, la disociación de las cadenas de ácido nucleico (que produce la liberación de la LSL a la disolución en masa en la que no puede difundir energía de onda evanescente) puede observarse en realidad como una pérdida del punto brillante en el sitio. Como se conoce en la técnica, la rigurosidad de hibridación puede controlarse variando parámetros tales como la temperatura y la fuerza iónica. El aumentar la temperatura aumenta la rigurosidad y desestabiliza el dúplex. Para esta técnica pueden usarse bloques térmicos convencionales y el dispositivo de dos placas preferido descrito anteriormente puede descansar simplemente sobre el bloque térmico. Pueden obtenerse temperaturas de fusión de los oligonucleótidos (Tm) que presentan buena correspondencia con las temperaturas de fusión en fase en disolución. La rigurosidad también aumenta disminuyendo la concentración eficaz de cationes tal como mediante dilución con agua. Por tanto, la guía de ondas y los procedimientos de la presente invención proporcionan un mecanismo para monitorizar en tiempo real las temperaturas de fusión de los oligonucleótidos. Controlando la rigurosidad de este modo puede distinguirse una cadena perfectamente complementaria de una que contiene incluso un único apareamiento de bases. Un sistema tal encontrará gran utilidad en la secuenciación de genes y en diagnósticos.

Los cambios de condiciones que afectan a las interacciones de anticuerpo-hapteno pueden evaluarse de un modo similar sustituyendo anticuerpo y haptenos por los pares de oligonucleótidos. Por ejemplo, el aumento de la temperatura desnaturalizará los ligandos de proteínas (por ejemplo, los anticuerpos), produciendo así una pérdida de la capacidad de unión. Esta desnaturalización de proteína puede monitorizarse en tiempo real usando la invención. Debe recordarse que cualquier par de unión análogo utilizado en el mantenimiento del SBM en la superficie de la guía de ondas, o en relacionar la LSL con el SBM de marca, deberá soportar preferentemente tales condiciones alteradas de manera que la unión del analito al SBM de captura sea el acontecimiento de disociación monitorizado.

Debe observarse que otra ventaja de la presente invención es que los reactivos y la muestra, por ejemplo, el conjugado-disolución de muestra, no necesitan lavarse del sitio de captura para permitir la detección. Con marcas fluorescentes y radiactivas, la marca sin unir debe eliminarse de la superficie para evitar una señal no deseada. Sin embargo, las LSL sin unir en la presente invención generalmente difunden de la profundidad de penetración y dejan de dar señal incluso sin eliminación física. La eliminación de la necesidad de lavar los componentes sin unir de la superficie contribuye significativamente a la velocidad con la que puede realizarse un ensayo.

En una inversión única de las determinaciones de la temperatura de fusión, el dispositivo y el procedimiento de la invención pueden usarse como un termómetro calibrado para monitorizar las temperaturas precisas de una guía de ondas, o como un control de calidad de fabricación para monitorizar la uniformidad de la transferencia de calor. Como termómetro, una serie de pares de oligonucleótidos de incrementos de temperaturas de fusión conocidos se colocan en una serie de sitios sobre la superficie reactiva. A medida que aumenta la temperatura, el par con la menor temperatura de fusión se disociará primero, seguido de los posteriores pares en el orden de sus

temperaturas de fusión. La temperatura de la superficie reactiva puede determinarse conociendo las temperaturas de fusión de estos oligonucleótidos calibradores. Se obtiene un efecto “similar a escalera” si los pares de oligonucleótidos se depositan en una matriz lineal en el orden de sus temperaturas de fusión conocidas.

Además, la uniformidad de la transferencia de calor puede evaluarse en un ámbito de control de calidad si la guía de ondas entera está cubierta con oligonucleótidos de temperaturas de fusión idénticas. La disociación deberá producirse instantáneamente sobre todos los sitios si el calentamiento es uniforme. Puede usarse un chip tal para determinar si el bloque térmico presenta variaciones que conducen a “puntos calientes” o “puntos fríos”.

Detección de luz difundida

Como se aludió anteriormente, la luz difundida puede detectarse visualmente o por medios fotoeléctricos. Para la detección visual, el ojo y el cerebro de un observador realizan las etapas de procesamiento de imágenes que producen la determinación de difusión o no en un sitio particular. La difusión se observa cuando el sitio aparece más brillante que el fondo de alrededor (véanse, por ejemplo, las figuras asociadas a los ejemplos). Si el número de sitios es pequeño, quizás una docena o menos, las etapas de procesamiento pueden efectuarse esencialmente simultáneamente. Si el número de sitios es grande (algunos cientos o más) se desea un sistema de detección fotoeléctrica.

Los sistemas de detección fotoeléctrica incluyen cualquier sistema que use una señal eléctrica que se modula por la intensidad de luz en el sitio. Por ejemplo, los fotodiodos, dispositivos de carga acoplada, fototransistores, fotorresistores y fotomultiplicadores son dispositivos de detección fotoeléctrica adecuados. Preferentemente, los detectores están dispuestos en una matriz correspondiente a la matriz de sitios sobre la superficie reactiva, algunos detectores se corresponden con porciones de no sitio. Sin embargo, son más preferidas las representaciones digitales de la superficie reactiva tal como aquellas convertidas por una cámara de dispositivo de carga acoplada (CCD) en combinación con software digitalizador de imágenes y de procesamiento de imágenes disponible.

Algunos ejemplos del uso de cámaras de CCD, tarjetas digitalizadoras de imágenes, ordenadores y software de procesamiento de imágenes se encuentran en la solicitud de EE.UU. en tramitación junto con la presente de copropiedad nº de serie 08/140.838 presentada el 21 de octubre de 1993 que se incorpora en este documento por referencia. Brevemente, la cámara o la cámara de vídeo de CCD forma una imagen de toda la superficie reactiva que incluye todos los sitios y porciones de no sitio, e introduce esta imagen a una tarjeta digitalizadora de imágenes de un ordenador. La imagen se convierte por el digitalizador de imágenes en información digital asignando un valor numérico a cada píxel. El sistema digital puede ser binario (por ejemplo brillo=1 y oscuridad=0), pero se prefiere una escala de grises de 8 bits en la que un valor numérico se asigna a cada píxel de forma que un cero (0) representa una imagen negra y doscientos cincuenta y cinco (255) representa una imagen blanca, representando los valores intermedios diversos tonos de gris en cada píxel.

La información digital puede mostrarse en un monitor o guardarse en una RAM o cualquier dispositivo de almacenamiento para la posterior manipulación. Pueden resaltarse dos tipos de manipulación. Primera, los datos digitalizados pueden convertirse e importarse en un software de aplicación de dibujo. Esto permitirá imprimir la imagen para fines de archivo como se hizo con las imágenes de vídeo generadas en los ejemplos para producir las Figuras 4-7, 8A y 9-12. Una aplicación de dibujo adecuada es el software Publishers PaintBrush (ZSoft Corp., Atlanta, Georgia); aunque muchos otros paquetes de software aceptarán o convertirán importaciones de archivos en una amplia variedad de formatos de archivo que incluyen “raw”, TIFF, GIF, PCX, BMP, RLE y muchos otros. Para las impresiones y manipulaciones de archivos, las conversiones y las importaciones no deberán alterar el contenido de los datos de manera que se produzca una representación real y fiel de la imagen.

En segundo lugar, el software de procesamiento de imágenes puede usarse para analizar la información digital y determinar los límites o contornos de cada sitio, y el valor de intensidad promedio o representativo en cada sitio. La intensidad establece una correlación positiva con la cantidad de LSL presente en el sitio, y la cantidad de LSL presente establece una correlación (negativa o positiva, dependiendo de la forma del ensayo) con la cantidad de miembro de unión al analito en tal sitio. Este tipo de manipulación de datos es evidente en los Ejemplos 2 y 5 y las Figuras 8B y 8C producidas.

Pueden acumularse y analizarse múltiples imágenes del mismo sitio con el tiempo. Para imágenes repetitivas, la guía de ondas o el elemento de TIR son tanto iluminados múltiples veces como, lo más probable, la lámpara sigue simplemente encendida hasta que se hacen imágenes en cada momento deseado. Comparando la difusión de la luz en el primer tiempo t_1 con la difusión en el segundo tiempo t_2 puede obtenerse información cinética. Esta información cinética es especialmente valiosa cuando el ensayo pretende ser cuantitativo, ya que la dependencia del tiempo (es decir, la tasa) del aumento o la disminución en la cantidad de difusión de la luz puede ser más indicativo con exactitud de los niveles de los miembros de pares de unión presentes en la muestra de fluido que la cantidad total de difusión mediante la reacción en cualquier punto de reacción dado en el tiempo. Adicionalmente, el uso de múltiples imágenes puede proporcionar un conjunto de datos con respecto al cual el aumento en la luz difundida detectada es de una función conocida con respecto al tiempo. La medición de la tasa de cambio de la intensidad de la luz difundida desde una región dada de la superficie reactiva frente al tiempo proporciona una tasa de reacción. Usando reacción cinética, la tasa guarda relación con una medición cuantitativa

de concentración de analito en la disolución de muestra. Por supuesto, los datos pueden recogerse más de dos veces; generalmente, cuantos más puntos de datos se obtengan, más fidedigna es la información cinética o de la tasa.

Puede usarse un procedimiento alternativo en lugar de la reacción cinética. En este procedimiento se integra la intensidad de la luz difundida frente al tiempo. El área obtenida por esta integración establece una correlación con la concentración del analito en disolución.

Ahora se mostrarán diversas realizaciones de la invención mediante ejemplo detallado. Los ejemplos sólo son ilustrativos y no pretenden limitar la invención.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Inmunoensayo de hCG usando LAM de colorante

A. Unión de SBM de captura a la guía de ondas

La guía de ondas usada en este documento era un cubreobjetos de vidrio estándar recubierto de anticuerpo comercialmente disponible de Corning (Corning, N.Y.; nº de catálogo 2, 22 mm^2). La superficie reactiva se creó sobre la guía de ondas de vidrio aplicando una pequeña cantidad (aproximadamente 2 µl) de una disolución de anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo policlonal de cabra dirigido contra βhCG purificado por afinidad, fosfato 10 mM, pH 7,4, NaCl 120 mM) a un área aproximadamente circular delimitada. La concentración de anticuerpo de partida fue 3,3 mg/ml y pudo usarse directamente o el anticuerpo pudo diluirse 1:10 en sacarosa al 1% (1% en peso por volumen [peso/volumen] de sacarosa disuelta en agua) antes de la aplicación. En cualquier caso, el anticuerpo en exceso se aplicó con respecto a la cantidad de proteína que podría retenerse sobre la superficie de la guía de ondas, y este anticuerpo en exceso se lavó con agua y se dejó secar.

Tras la inmovilización del anticuerpo a la guía de ondas, la superficie de vidrio se trató con caseína tratada alcalina al 0,05% en agua para bloquear interacciones no específicas entre la superficie de vidrio y el material en la muestra de fluido. Se incubó un volumen suficiente de la disolución de caseína al 0,05% para cubrir la superficie a temperatura ambiente durante 1-5 minutos y el vidrio se lavó luego con agua usando un frasco lavador. La caseína recubrió la superficie por adsorción física y produjo una superficie que mostró “acción de extensión”, es decir, mediante la aplicación cuidadosa del chorro de agua toda el agua sobre la superficie del chip se eliminó por flujo por gravedad.

B. Ensamblaje del dispositivo

Un dispositivo para alojar los reactivos de ensayo consistió en dos cubreobjetos de vidrio como se muestra en las Figuras 2A-2C. Un cubreobjetos (la guía de ondas) contuvo el SBM de captura unido y el otro cubreobjetos de vidrio creó el canal para contener la muestra-disolución de conjugado. Los dos cubreobjetos estaban compensados y se mantuvieron juntos por cinta de doble capa (Arcare 7710B, Adhesives Research Inc., Glen Rock, Penn) para formar un canal de 16 mm de ancho y aproximadamente 75 µm de espesor (el espesor de la cinta de doble capa). El canal creó orificios de aproximadamente 25 µl de volumen.

C. Iluminación de la guía de ondas

Entonces, la guía de ondas se iluminó con una fuente de luz que comprendía una bombilla incandescente de 150 vatios con una apertura de rendija de aprox. 2 mm. La guía de ondas se insertó en la rendija de la fuente de luz de manera que la luz brillara en el borde receptor de la luz de 2 mm de espesor de la guía de ondas (véase la Figura 2A). Aunque la guía de ondas se insertó en la rendija a aproximadamente 45º con respecto a la máscara, no se hicieron intentos por optimizar el ángulo de luz incidente ni para eliminar la luz que incidía sobre el elemento a menos del ángulo crítico.

D. Adición de muestra, conjugado difusor de la luz, colorante absorbente de la luz

A continuación se añadieron una disolución que contenía la muestra, un conjugado difusor de la luz y un colorante absorbente de la luz a la superficie reactiva de forma que se cubriera el sitio de captura. El conjugado se preparó usando una partícula de selenio coloidal (patente de EE.UU. nº 4.954.452 a Yost y col.) del siguiente modo: 1 ml de coloide de selenio (concentración de D.O. 32, a la máxima longitud de onda de absorción de 546 nm) se mezcló durante 10 segundos con 2,5 µl de anticuerpo monoclonal dirigido contra αhCG (1 mg/ml, en PBS) y 30 µl de BSA al 20% (20 g/100 ml disuelto en agua). Entonces se añadieron diez µl del conjugado de selenio a 40 µl de calibrador de hCG (controles de hCG en orina de Abbott Laboratories (Abbott Park, IL; nº de catálogo 3A28-02)). Finalmente, a este mezcla se añadieron luego 2 a 3 µl de colorante alimentario azul de McCormick (McCormick, Hunt Valley, MD) dando una D.O. final de 140-200 a 630 nm.

E. Detección de la señal difundida por la luz

La luz difundida derivada de la interacción de la onda de luz evanescente con la marca difusora de la luz puede detectarse visualmente o por medio de un sistema de análisis de vídeo convencional. En el caso de la detección visual se observó una señal en aproximadamente 1 minuto y se volvió muy visible en el plazo de 5

minutos. Esta señal visual se registró usando una cámara de CCD (dispositivo de carga acoplada) de 8 bits convencional (Cohu modelo 4815 Cohu, Inc., San Diego, CA). Se creó una representación digital de la imagen usando un digitalizador de imágenes (Imaging Technology Incorporated, PC VISION más tarjeta digitalizadora de imágenes; Woburn, Mass) en un Compac DeskPro 386/20e (Compaq Computer Corporation, Houston, TX). El archivo de datos de la imagen digitalizada se convirtió y se importó en el software Publishers PaintBrush (ZSoft Corp., Atlanta, Georgia) a partir del cual se imprimió la imagen en una impresora de 300 dpi de resolución. La imagen impresa se muestra como la Figura 4.

Ejemplo 2. Ensayos mejorados de guías de ondas de hCG

A. Configuración del ensayo

El ensayo se ejecutó como se describe en el Ejemplo 1, sin embargo, el conjugado de selenio se concentró un factor de 30X del siguiente modo. Se mezclaron diez ml de coloide de selenio, D.O. 32 a 546 nM de luz, con 25 µl de anticuerpo dirigido contra hCG (1 mg/ml; descrito en el Ejemplo 1) y 300 µl de BSA al 20% (véase el Ejemplo 1). La disolución resultante se colocó en dos tubos de centrífuga de 6 ml de capacidad y se centrífugo usando el modelo de centrífuga Centra-4B (International Equipment Company, Needham Heights, MA) a 5.000 rpm durante 10 minutos para sedimentar el conjugado de selenio. Se eliminaron aproximadamente 9,66 ml del sobrenadante, de color amarillo paja, de manera que quedara el sedimento de selenio, de color rojo oscuro, como estaba. Los sedimentos de conjugado de selenio se resuspendieron y se combinaron en los 0,33 ml restantes de sobrenadante. Las "muestras" de hCG fueron los controles positivo alto de hCG en orina, positivo bajo y cero obtenidos de Abbott Laboratories (Abbott Park, IL; nº de catálogo 3A28-02) que contenían, respectivamente, 250, 50 y 0 mUI/ml de hCG. Además, a cada uno de los controles se añadieron 0,5 ml de caseína al 10% (Tris 100 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, 10% en peso/volumen de caseína) como agente de bloqueo para evitar la unión no específica, concentración de caseína final 0,9%. Las guías de ondas se construyeron como se describe en el Ejemplo 1, excepto que el anticuerpo policlonal dirigido contra hCG se aplicó a la superficie de vidrio con un capilar de vidrio de forma que el sitio fue un símbolo "más" dibujado a mano.

Se mezclaron volúmenes iguales de conjugado de selenio concentrado 30X (descrito anteriormente) y muestra y se aplicaron inmediatamente a la guía de ondas. En este caso, la densidad óptica de la mezcla de conjugado-muestra (D.O. aproximadamente 465) fue tan grande que no se necesitó la adición del colorante alimentario para evitar la difusión de fondo. Además, la alta concentración de conjugado aumentó sorprendentemente tanto la sensibilidad como la velocidad del revelado de la señal de la guía de ondas sin un aumento en la difusión de fondo. La muestra de 0 mUI/ml no dio señal apreciable, la muestra de 25 mUI/ml (concentración final) dio una señal visible en aproximadamente 30 segundos y la muestra de 125 mUI/ml (concentración final) dio una señal en 5 segundos o menos. Se obtuvo la imagen de la Figura 5, se digitalizó y se imprimió como en el Ejemplo 1-D muestra una señal "más" apenas visible a 1 segundo para la muestra de hCG positiva alta (125 mUI/ml). Tiempo= 0 muestra el llenado del canal de la guía de ondas con la disolución de conjugado; tiempo= 1 segundo muestra la formación inicial casi instantánea de una señal más visible; y tiempo= 5 y 20 segundos muestra una señal más claramente visible.

B. Determinación de la sensibilidad

Los chips de las guías de ondas se hicieron como antes, sin embargo, a la guía de ondas se aplicó un único punto de disolución de anticuerpo (véase el Ejemplo 1; anticuerpo policlonal dirigido contra hCG a 1 mg/ml) para formar un único sitio sobre la superficie reactiva. Para estimar la sensibilidad en este sistema, el experimento se repitió con 6 muestras ejecutadas a 0 mUI/ml y 5 muestras ejecutadas a 31 mUI/ml (concentraciones nominales de hCG, no se realizaron mediciones reales). Se mezclaron las muestras y el conjugado durante 1 minuto, se aplicaron al canal de la guía de ondas y se adquirió una imagen de vídeo digital después de 1 minuto de la generación de la señal usando un digitalizador de imágenes y una cámara de vídeo de CCD. Las imágenes digitales consisten en una serie de valores de escalas de grises de 8 bits que oscilan de 0 (oscuro) a 255 (blanco). Por tanto, el archivo digital consiste en una serie de tales números y cada número se corresponde con una localización de píxel particular y única de la imagen.

Los datos digitalizados resultantes se analizaron usando el software Image Pro Plus (Media Cybernetics, Silver Spring, MD) en el que se usó un área circular, aproximadamente el tamaño de un punto de señal, para medir los valores numéricos de la escala de grises de los datos de imágenes. Se promediaron los valores digitales dentro del área de medición circular, es decir, se sumó cada valor dentro del círculo y la suma resultante se dividió entre el número de tales valores. Tales valores se obtuvieron para el sitio de captura y para una proporción de no sitio de fondo representativa adyacente al sitio de la señal. La diferencia, señal menos antecedentes, constituyó el valor medido. Los datos obtenidos para este experimento se muestran en la Tabla 2.1:

TABLA 2.1

	0 mUI/ml			31 mUI/ml	
Señal	Fondo	Señal neta	Señal	Fondo	Señal neta
50,9	44,8	6,1	69,6	50,2	19,4
51,6	44,6	7,1	78,4	54,7	23,7
50,6	44,1	6,4	112,4	77,0	35,6
64,1	58,6	5,6	102,3	642	38,1
66,2	58,7	7,5	105,7	76,0	29,7
54,8	48,0	6,8			
	media:	6,6 ± 0,7		media:	29,2 ± 7,8

La señal neta media para el experimento de 0 mUI/ml es 6,6 ± 0,7 mUI/ml y para el experimento de 31 mUI/ml 29,2 ± 7,8 mUI/ml. Por tanto, mediante interpolación lineal, 1 nivel de gris = 1,4 mUI/ml y un valor de señal neta igual a 2 desviaciones estándar por encima de la señal neta de 0 mUI/ml, es decir, 1,4, da un cálculo estimado de la sensibilidad de aproximadamente 2 mUI/ml.

Ejemplo 3. Inmunoensayo de hormona estimulante de la tiroides (TSH)

A. Reactivo de captura de unión a la fase sólida

Se preparó una guía de ondas como se describe en el Ejemplo 1, excepto que el sitio de captura de anticuerpo se creó sobre la superficie de vidrio de la guía de ondas aplicando una pequeña cantidad (aproximadamente 2 µl) de una disolución de anticuerpo compuesta por anticuerpo policlonal dirigido contra αTSH purificado por afinidad a una concentración de 0,25 a 0,5 mg/ml. La disolución de anticuerpo contiene sacarosa al 1%. El anticuerpo se dejó secar y así se inmovilizó y se adsorbió sobre la superficie de vidrio, se aclaró con agua para HPLC y se secó mediante aire forzado. Tras la inmovilización, la superficie de vidrio se trata durante ≤1 minuto con caseína tratada alcalina al 0,05% (Tris 100 mM, pH 7,8, NaCl 150 mM) para bloquear las interacciones no específicas entre la superficie reactiva y el material en la muestra de fluido; y para promover el flujo a través del canal. La caseína en exceso se aclara del portaobjetos con agua para HPLC en una “acción de extensión”. Cualquier líquido restante se seca mediante aire forzado.

El desechable se ensambló como se describe en el Ejemplo 1 y se colocó en la apertura de la rendija de la fuente de luz como se describe en el Ejemplo 1.

B. Adición de muestra y conjugado difusor de la luz concentrado

A continuación, una disolución que contenía muestra y un conjugado difusor de la luz se añadió a la superficie reactiva de forma que se cubriera el sitio de captura. El conjugado difusor de la luz se preparó marcando un segundo anticuerpo (monoclonal dirigido contra βTSH; 10 µg/ml) con coloide de selenio del Ejemplo 1 diluido a D.O. 16 (longitud de onda máxima de absorción de 546). Después de mezclarse durante 10 segundos, la conjugación se bloqueó con BSA al 0,6% y se centrifugó a 8000 rpm durante 3-5 minutos para concentrarse. El conjugado se resuspendió en 1/20 de su volumen original. A continuación, 15 µl de tampón de muestra, que consistieron en 7,5 µl de conjugado de selenio mezclado con 7,5 µl de caseína tratada alcalina al 10% (Tris 100 mM, pH 7,8, NaCl 150 mM) para dar una concentración de caseína final del 2,5%, se mezclaron con 15 µl de muestra de TSH. Las muestras de TSH fueron los calibradores de ensayo A-F IMx® Ultrasensitive hTSH obtenidos comercialmente de Abbott Laboratories (nº de catálogo A3A62-01) y que tienen niveles de TSH del siguiente modo: A=0, B=0,5, C=2, D=10, E=40 y F=100 µUI/ml. Estos calibradores se usaron a una dilución 1:1 con el tampón de muestra dando una concentración final de la mitad de la establecida como concentración del calibrador.

C. Detección de la señal difundida por la luz

La luz difundida derivada de la interacción de la onda de luz evanescente con la marca difusora de la luz se detectó visualmente y por medio de un sistema de análisis de vídeo convencional (véase, por ejemplo, el Ejemplo 1). En el caso de la detección visual, una señal se observó en aproximadamente 1 minuto. Se obtuvo la imagen de la Figura 6, se digitalizó y se imprimió como en el Ejemplo 1-D. Como se muestra en la Figura 6, se observa una señal por encima del fondo en 1 minuto. La sensibilidad estimada del sistema con detección visual es 0,25 µUI/ml de TSH. La señal a 0,125 µUI/ml de TSH es apenas visible al ojo y distinguible por encima de cero.

Ejemplo 4. Ensayo de hibridación de ADN

A. Construcción de guías de ondas de ADN

Las guías de ondas de ADN para la detección de mutaciones genéticas humanas que producen fibrosis quística se construyeron a partir de sustratos de vidrio de 1 cm cuadrado. Los oligonucleótidos se inmovilizaron al vidrio para proporcionar múltiples sitios de captura en la superficie reactiva. En particular, nueve oligonucleótidos diferentes, designados CAT01 a CAT09 (SEC ID Nos. 1 - 9) se aplicaron a la superficie de vidrio de la guía de ondas para formar un patrón de matriz 3 × 3 de forma que el nº de CAT se correspondió con la posición ocupada por el mismo número en un teléfono de tonos convencional. Los puntos de ADN tuvieron aproximadamente 2 mm de diámetro y estaban separados aproximadamente 2 mm. La secuencia y el sitio de mutación de CAT01 a CAT09 (SEC ID Nos. 1 - 9) se muestran en la Tabla 4.1.

TABLA 4.1

SEC ID Nº	Designación de oligonucleótidos	Secuencia 5'---------- a ---------- 3	Designación de la mutación
1	CAT01	TATCATCTTTGGTGT-NH_2	Δ508WT
2	CAT02	AATATCATTGGTGTT-NH_2	Δ508
3	CAT03	AGTGGAGGTCAACGA-NH_2	G551D WT
4	CAT04	AGTGGAGATCAACGA-NH_2	G551D
5	CAT05	AGGTCAACGAGCAAG-NH_2	R553X WT
6	CAT06	AGGTCAATGAGCAAG-NH_2	R553X
7	CAT07	TGGAGATCAATGAGC-NH_2	G551D + R553X
8	CAT08	TGGAGATCAACGAGC-NH_2	G551D + R553X WT
9	CAT09	TGGAGGTCAATGAGC-NH_2	G551D WT+ R553X

Las mutaciones genéticas humanas se indican por la notación convencional. Por ejemplo, Δ508 indica una deleción de 3 pares de bases en la posición 508 del polipéptido regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (J. Zielenski y col. Genomics 10:214-228, 1991). “WT” indica la secuencia natural o normal en esta posición. La presencia del grupo amino en el extremo 3' del oligonucleótido facilita la inmovilización del ADN a la superficie de la guía de ondas, sin embargo, el mecanismo no se conoce actualmente. Las disoluciones de ADN se prepararon por Synthecell (Columbia, MD) y se diluyeron 1:20 en tampón PBS (solución salina tamponada con fosfato, pH 7,4) y se aplicaron a la superficie de vidrio de la guía de ondas usando el extremo romo de una barrena de aproximadamente 1 mm de diámetro. El ADN se inmovilizó sobre una superficie de vidrio limpia o a una superficie de vidrio previamente recubierta con caseína al 0,05%; los resultados de la hibridación fueron indistinguibles. Las concentraciones finales de ADN aplicadas a la superficie de vidrio de la guía de ondas oscilaron de un valor alto de 14 μM para CAT02 a uno bajo de 0,9 μM para CAT08 y se determinó comparando la concentración de material de partida recibida de Synthecell. Después de la aplicación, las disoluciones de ADN se dejaron secar sobre el chip a temperatura ambiente o, en días húmedos, entre aproximadamente el 35% y el 80% de humedad relativa, en una estufa de incubación a 50-70ºC hasta sequedad (aproximadamente 10 minutos). Este procedimiento formó nueve “puntos” o sitios de captura de hibridación en la matriz 3 x 3 descrita anteriormente.

B. Hibridación

Para evaluar el rendimiento de la guía de ondas de ADN se sintetizaron nueve oligonucleótidos adicionales, CAT21B a CAT29B (SEC ID Nos. 10-18) por Synthecell con una marca de biotina en el extremo 3'. Las secuencias de los oligonucleótidos de ADN de prueba se enumeran en la Tabla 4.2.

TABLA 4.2

SEC ID Nº	Designación de oligonucleótidos	Secuencia 5' ---------- a ---------- 3
10	CAT21B	ACACCAAAGATGATA-biotina
11	CAT22B	AACACCAATGATATT-biotina
12	CAT23B	TCGTTGACCTCCACT-biotina
13	CAT24B	TCGTTGATCTCCACT-biotina
14	CAT25B	CTTGCTCSTTGACCT-biotina

15	CAT26B	CTTSCTCATTCACCT-biocina
16	CAT27B	GCTCATTGATCTCCA-biotina
17	CAT28B	GCTCGTTGATCTCCA-biotina
18	CAT29B	GCTCATTGACCTCCA-biotina

Los oligonucleótidos se diseñaron y se nombraron de forma que CAT21B (SEC ID Nº 10) fuera complementario a CAT01 (SEC ID Nº 1), CAT22B (SEC ID Nº 11) fuera complementario a CAT02 (SEC ID Nº 2), etc., hasta CAT29 (SEC ID Nº 18) que es complementario a CAT09 (SEC ID Nº 9). Las concentraciones variaron de una alta de 473 mM para CAT25B (SEC ID Nº 14) a una baja de 151 mM para CAT27B (SEC ID Nº 16). 1 µl de cada una de las nueva muestras de ADN se diluyó en 1 ml de tampón de hibridación (caseína al 1%, Tris 10 mM, pH 7,4, NaCl 15 mM), y se aplicó una diferente a cada una de las nueve guías de ondas de ADN diferentes y se incubaron a temperatura ambiente (aproximadamente 23ºC) durante 5 minutos. La superficie de las guías de ondas de ADN se lavó con PBS usando un frasco lavador y luego se guardaron bajo PBS hasta la detección de la hibridación.

C. Detección de la hibridación

La hibridación de los nueve ADN marcados con biotina diferentes se detectó en la guía de ondas por luz que se difundió de un anticuerpo dirigido contra biotina conjugado con selenio. El conjugado de selenio se preparó mediante la adición de 2,5 µl de un anticuerpo dirigido contra biotina (anticuerpo policlonal de conejo dirigido contra biotina, 1,13 mg/ml en PBS, pH 7,4, véase el documento EP 0 160 900 B1 a Mushahwar y col. correspondiente al documento de EE.UU. nº de serie 08/196885) a 1 ml de coloide de selenio (concentración de D.O. 32) del Ejemplo 1, seguido de la adición de 30 µl de albúmina de suero bovino (BSA en polvo disuelta en agua para dar una disolución al 20% en peso/volumen). Se aplicaron cincuenta µl de la disolución de conjugado a la superficie de la guía de ondas de ADN y la luz se dirigió al lado de la guía de ondas para observar la unión de selenio a los diversos sitios de captura de ADN. La hibridación positiva fue visible en muchos sitios en el plazo de 1 minuto. Las guías de ondas de ADN se lavaron con PBS para eliminar el conjugado de selenio en exceso, se iluminaron para efectuar la difusión de la luz excitada por la guía de ondas y se obtuvieron imágenes usando una cámara de CCD Cohu modelo 4815. La imagen se digitalizó y se imprimió como en el Ejemplo 1-D, y se muestra en la Figura 7. Todo el patrón de hibridación de ADN se detectó usando la guía de ondas en una única medición de imágenes y permitió la determinación de la secuencia de ADN del oligonucleótido aplicado a la guía de ondas. En el caso de CAT21B (SEC ID Nº 10) y CAT22B (SEC ID Nº 11) (primeros dos marcos de la Figura 7), el patrón de hibridación fue relativamente simple debido a que hubo una homología de secuencias despreciable de estos oligonucleótidos con sitios de captura de ADN distintos de CAT01 (SEC ID Nº 1) y CAT02 (SEC ID Nº 2), respectivamente. Sin embargo, en el caso de CAT23B-CAT29B (SEC ID Nos. 12-18), la significativa homología de secuencias produce un patrón de unión más complicado.

Ejemplo 5. Fusión de ADN en tiempo real

A. Construcción de guías de ondas de ADN

Se hicieron guías de ondas que contenían dos puntos de captura de ADN aplicando 1 µl de una disolución de oligonucleótido que contenía CAT03 (SEC ID Nº 3) y CAT04 (SEC ID Nº 4; dilución 1:20 en PBS) al cubreobjetos de la guía de ondas (recubierta con caseína al 0,05% como en el Ejemplo 1), seguido de secado a temperatura ambiente. El ADN en exceso se aclaró de los dos puntos con agua y luego los chips se secaron a temperatura ambiente. La guía de ondas de ADN con dos puntos se unió a otro cubreobjetos de vidrio para formar un desechable para alojar los reactivos de ensayo como en el Ejemplo 1.

B. Hibridación y detección

Se preparó una disolución de tanto CAT23B (SEC ID Nº 12) como CAT24B (SEC ID Nº 13) diluyendo 1 µl en 1 ml de caseína al 1%, Tris 10 mM, pH 7,4, NaCl 15 mM. La disolución se introdujo en el desechable de canal de la guía de ondas por flujo capilar y se permitió la hibridación durante un periodo de 5 minutos a temperatura ambiente. La disolución de ADN se desplazó del canal introducción un conjugado de selenio (Ejemplo 4) y la guía de ondas se colocó en la fuente de luz para efectuar la detección. En el plazo de segundos aparecieron dos puntos brillantes en los sitios de captura de ADN que indicaron que se había producido la hibridación. Se esperó que la hibridación entre CAT23B (SEC ID Nº 12) y CAT03 (SEC ID Nº 3) fuera como la hibridación entre CAT23B (SEC ID Nº 12) y CAT04 (SEC ID Nº 4) debido a que la diferencia entre CAT23B (SEC ID Nº 12) y CAT04 (SEC ID Nº 4) sólo era un único par de bases. A condiciones de baja temperatura (es decir, temperatura ambiente) y alta sal (NaCl 15 mM) no hubo discriminación suficiente en el procedimiento de hibridación para distinguir un único desapareamiento de pares de bases.

C. Fusión en tiempo real

Después de la observación del patrón de hibridación a temperatura ambiente, la temperatura de la guía de ondas de ADN se aumentó usando un bloque térmico aplicado al lado sin guía de ondas de canal (es decir, el

segundo cubreobjetos de vidrio usado para crear el canal del desechable). El efecto del calor sobre el patrón de hibridación se registró en tiempo real usando una cámara de CCD y un grabador de cinta de vídeo (VCR) centrado en la superficie de la guía de ondas. La temperatura del bloque térmico debajo de la guía de ondas (es decir, en contacto con el segundo cubreobjetos de vidrio usado para crear el canal del desechable) se midió usando un termopar. Se registró una lectura de temperatura digital (Watlow, controlador de temperatura serie 965, Watlow Controls, Winona, MN) obteniendo imágenes con la cámara de CCD. A medida que aumentaba la temperatura, la intensidad de sitios de ADN disminuía como era de esperar a partir de la fusión de ADN. Además, los sitios de ADN contenían la fusión de ADN hibridado desapareado a temperaturas más bajas que los sitios que contenían el ADN de apareamiento exacto. Como resultado fue posible distinguir entre hibridación de apareamiento exacto y de desapareamiento de una única base y así permitir la detección de mutaciones de una única base. Los datos se recogieron en forma de imágenes de vídeo a cada incremento de 1ºC y se digitalizaron usando el digitalizador de imágenes como antes. La Figura 8A es la representación impresa de los datos a intervalos de 5ºC que muestra que aproximadamente a 50ºC los puntos desapareados empiezan a perder intensidad, pero los pares perfectamente apareados siguen siendo visibles hasta aproximadamente 60ºC. La intensidad de los sitios de captura se midió como en el Ejemplo 2 y la intensidad de puntos media se calculó para cada temperatura. La Figura 8B es una representación de curvas de fusión para CAT23B (SEC ID Nº 12) y la Figura 8C es una representación de curvas de fusión para CAT24B (SEC ID Nº 13). Las temperaturas de fusión se estiman como el punto a mitad de camino entre la meseta superior e inferior.

Ejemplo 6. Sensibilidad del ensayo de hibridación de ADN

La sensibilidad del ensayo de hibridación de la guía de ondas ADN se estimó observando la intensidad de la señal difusora a medida que se reducía la concentración de ADN aplicada a la guía de ondas. Se hicieron cuatro guías de ondas de ADN idénticas aplicando 0,5 µl de CAT01 (SEC ID Nº 1) y CAT03 (SEC ID Nº 3), que se diluyeron por separado 1:20 en PBS. Este procedimiento se repitió 2 veces para formar una matriz 2 × 2 con CAT01 (SEC ID Nº 1) en las esquinas izquierda superior y derecha inferior (como se visualiza) y con CAT03 (SEC ID Nº 3) en las esquinas derecha superior e izquierda inferior (como se visualiza). Los puntos de ADN se secaron en un horno a 70ºC durante 15 minutos y, sin lavar el ADN en exceso, se fijó un segundo cubreobjetos para formar un canal como en el Ejemplo 1. El ADN de CAT23B (SEC ID Nº 12) se diluyó en tampón de hibridación (caseína al 1%, Tris 10 mM, pH 7,4, NaCl 15 mM) para dar concentraciones de 39,6 nM, 4 nM y 0,4 nM. El tampón de hibridación sólo se usó como la cuarta concentración de ADN (0 nM). Se introdujeron treinta µl de cada disolución de ADN en uno de los cuatro dispositivos de guía de ondas. La disolución de ADN se aplicó al hueco abierto en un extremo del desechable de la guía de ondas y el canal se llenó posteriormente por acción capilar. Las disoluciones se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos para permitir que se produjera la hibridación. A continuación se aplicaron 30 µl de anticuerpo dirigido contra biotina conjugado con selenio (Ejemplo 4) a un extremo del canal y una toallita de papel se aplicó en el extremo opuesto del canal para eliminar la disolución de ADN y, por desplazamiento, llenar el canal con disolución de conjugado. La hibridación se detectó mediante iluminación de la guía de ondas de ADN a medida que el canal se llenaba con disolución de conjugado. Después de un minuto de unión del conjugado de selenio se adquirió una imagen digital de la señal de la guía de ondas usando una cámara de CCD Cohu a 30 fotogramas por segundo. La imagen importada e impresa de cada uno de los cuatro chips se muestra en la Figura 9. La hibridación específica se indicó por la presencia de señal sólo en los sitios de CAT03 (SEC ID Nº 3). No hubo señal de ningún sitio sobre el chip con 0 nM de muestra y no hubo señal de los sitios de CAT01 (SEC ID Nº 1) a ninguna concentración. La menor concentración de ADN usada en el experimento, 0,4 nM de CAT03, se detectó por la guía de ondas bajo estas condiciones y representa una medición aproximada de la sensibilidad. Como comparación típica, Pease y col., Proc. Natl. Acad. Sci., 91: 5022-5026, 1994, informan de la detección de una concentración 10 nM de ADN de marca fluorescente conjuntamente con un sistema de barrido por láser en un tiempo de lectura de minutos en lugar de 1/30 de un segundo.

Ejemplo 7. Detección de la guía de ondas de ADN de alta densidad de sitios

Se creó una guía de ondas de ADN de alta densidad de sitios (definida como el número de sitios/chip, a diferencia de la cantidad de ADN por sitio) mediante múltiples aplicaciones de un único oligonucleótido, CAT01 (SEC ID Nº 1). Se programó una tabla Asymtek Automove 102 XYZ (Asymtek, Carlsbad, CA) para sumergir un alfiler de 150 µm de diámetro en una disolución de ADN de CAT01 (dilución 1:20 de CAT01 en PBS) y luego el alfiler tocó la superficie de una guía de ondas de vidrio de 1 cm cuadrado recubierta de caseína. El procedimiento se repitió 323 veces para formar una matriz 18 × 18 de puntos de ADN de 150 µm de diámetro separados 300 µm (la matriz 18 × 18 debería tener 324 puntos, sin embargo, un error de programación omitió la colocación de un punto produciendo un “agujero” en la porción derecha superior (como se visualiza) de la matriz y, de ahí 323 puntos). Toda la matriz ocupó un cuadrado de aproximadamente 5,1 mm de lado (26 mm^2) en el centro de la guía de ondas de 1 centímetro cuadrado.

Las guías de ondas resultantes se secaron, se lavaron con agua y se secaron de nuevo en la preparación para la hibridación. La hibridación se llevó a cabo colocando una disolución de CAT21B (SEC ID Nº 10) diluida 1:1000 en caseína al 1%, Tris 10 mM, pH 7,4, NaCl 15 mM sobre la superficie de la guía de ondas de manera que cubriera toda la matriz durante 5 minutos a temperatura ambiente. La disolución de ADN se aclaró de la superficie de la guía de ondas usando PBS y la hibridación se detectó luego cubriendo la superficie de la guía de ondas con anticuerpo dirigido contra biotina conjugado con selenio (Ejemplo 4) e iluminando la guía de ondas. La hibridación

del ADN de CAT21B (SEC ID Nº 10) a la matriz de ADN pudo observarse visualmente en aproximadamente 30-60 segundos. La disolución de conjugado en exceso se lavó colocando el chip en una placa de PBS. El patrón de hibridación se registró mediante la digitalización de una imagen de vídeo usando un digitalizador de imágenes como antes. Una representación impresa de los datos de imágenes se muestra en la Figura 10. Como puede verse, la detección de la guía de ondas permitió la medición y la diferenciación simultánea de los 323 sitios de hibridación.

Ejemplo 8. Disociación de ADN hibridado mediante baja fuerza iónica

Otra ventaja de la detección de la guía de ondas es la reutilizabilidad. En este caso, la muestra ADN hibridada a una superficie de la guía de ondas debe desprenderse del chip sin dañar el ADN fijado a la superficie. Este ejemplo demuestra la utilidad de la guía de ondas para monitorizar el procedimiento de regeneración.

Las guías de ondas de ADN de fibrosis quística que llevan los oligonucleótidos CAT01 a CAT09 (SEC ID Nos. 1-9) en una matriz 3 × 3 se construyeron como se describe en el Ejemplo 4 usando un cubreobjetos de vidrio nº 2 de 22 mm cuadrados. Se formó un canal de flujo fijando un segundo cubreobjetos a la guía de ondas usando adhesivo de silicona (Dow Corning, Midland, MI) y dos trozos de tubo en esquinas diagonales opuestas para proporcionar una entrada y salida. Los cubreobjetos se compensaron como se describe en el Ejemplo 1 para permitir la inyección de luz en el cubreobjetos superior que hizo de guía de ondas. Se bombeó manualmente una disolución de CAT23B (SEC ID Nº 12) que es perfectamente complementario a CAT03 (SEC ID Nº 3)) en tampón de hibridación (caseína al 1% en Tris 10 mM, pH 7,4, NaCl 12 mM) en el canal de flujo usando una jeringuilla; el flujo se detuvo y la hibridación se llevó a cabo durante 1 minuto. A continuación se bombeó una disolución de anticuerpo dirigido contra biotina conjugado con selenio (Ejemplo 4) en el canal desplazando la disolución de ADN; el flujo se detuvo; y la hibridación se detectó mediante la iluminación de la guía de ondas en presencia del conjugado (como antes). A continuación, el canal se lavó bombeando en PBS para desplazar la disolución de conjugado. Finalmente, el complejo de ADN hibridado-anticuerpo dirigido contra biotina conjugado con selenio se disoció de la superficie de la guía de ondas bombeando agua pura en el canal. El agua aumenta las condiciones de rigurosidad diluyendo el NaCl para disminuir la fuerza iónica. La disociación del ADN y el selenio de los sitios de captura se observó en tiempo real y se registró usando una cámara de vídeo y una VCR. En varios momentos del procedimiento de disociación la imagen de vídeo se capturó usando un digitalizador de imágenes, se digitalizó y se imprimió como antes, y los resultados se muestran en la Fig. 11. Debido a las excesivas burbujas de aire en la cámara de flujo sólo se muestra la matriz 2 x 2 derecha superior; por ejemplo, cuatro sitios correspondientes a los números 2 (CAT02, SEC ID Nº 2), 3 (CAT03, SEC ID Nº 3), 5 (CAT05, SEC ID Nº 5) y 6 (CAT06, SEC ID Nº 6). Como puede verse, el procedimiento de disociación fue seguido de la introducción inicial de medio de baja fuerza iónica para la eliminación final de sustancialmente todas las señales de la guía de ondas del chip de ADN. De ahí que la guía de ondas permitiera que el operador monitorizara el procedimiento de regeneración de la guía de ondas de ADN para la reutilización. En particular, la información en tiempo real en la regeneración puede usarse para controlar el tiempo de regeneración y así mejorar los tiempos de procesamiento en una aplicación de diagnóstico.

Ejemplo 9. Prueba de anticuerpos múltiplex para ADN

Se creó una prueba de anticuerpos múltiplex para productos de ADN bihaptenados usando un SBM de biotina común y un SBM de “captura” diferente para cada uno de los 3 productos de oligonucleótidos. Tales oligonucleótidos bihaptenados son representativos de productos obtenidos por una reacción en cadena de ligasa múltiplex como se desvela en el documento de EE.UU. nº de serie 07/860.702 presentado el 31/03/92 publicado como el documento WO 93/20227 (Abbott Labs). La guía de ondas se construyó inmovilizando anticuerpos monoclonales dirigidos contra fluoresceína, dirigidos contra adamantano y dirigidos contra quinolina a un cubreobjetos de microscopio de vidrio nº 2 de Corning. Los anticuerpos dirigidos contra adamantano se desvelan en el documento de EE.UU. nº de serie 808.508 presentado el 17/12/91 y en el documento PCT/US93/05534. Los anticuerpos dirigidos contra quinolina se desvelan en el documento de EE.UU. nº de serie 07/858.820 presentado el 21/03/92 publicado como el documento WO 93/20094. Todos estos documentos se incorporan en este documento por referencia.

Los anticuerpos se diluyeron 1:10 en agua y se aplicaron aproximadamente 0,5 µl a la guía de ondas formando 3 puntos espacialmente separados como se muestra en la Figura 12a con antifluoresceína en el vértice derecho superior (punto nº 1), antiadamantano en el izquierdo (punto nº 2) y antiquinolina en el izquierdo inferior (punto nº 3). Un segundo portaobjetos de vidrio se aplicó a la guía de ondas para formar un canal (como en el Ejemplo 1). Se diluyeron 3 µl de ADN monocatenario sintético que contenía una biotina en el extremo 3' y tanto fluoresceína, adamantano como quinolina en el extremo 5' en 50 µl de caseína al 1%, Tris 10 mM, pH 7,4, NaCl 15 mM. Las concentraciones de ADN finales fueron aproximadamente 100 nM. Las secuencias de ADN se muestran en la Tabla 9.1.

TABLA 9.1

SEC ID Nº	Secuencia 5' 3'
19	biotina-GGACACGGACACGGACACGGACAC-fluoresceína
20	biotina-GGACACGGACACGGACACGGACAC-quinolina
21	biotina-GGACACGGACACGGACACGGACAC-adamantano

Las disoluciones resultantes se mezclaron con volúmenes iguales de anticuerpo dirigido contra biotina conjugado con selenio (Ejemplo 4) y se introdujeron en el canal de la guía de ondas mediante acción capilar. Las Figuras 12b a 12d muestran los resultados usando disoluciones de ADN que contenían una única especie marcada. La SEC ID Nº 21 se usa en la Figura 12b, la SEC ID Nº 19 se usa en la Figura 12c y la SEC ID Nº 20 se usa en la Figura 12d. En la Figura 12e, una mezcla de ADN de quinolina-biotina y ADN de fluoresceína-biotina produjo señales detectables en los dos sitios de captura apropiados (puntos 1 y 3). De ahí que el sistema de la guía de ondas permitiera la detección simultánea de múltiples analitos en una mezcla.

El ejemplo anterior describe varias realizaciones específicas de la invención, pero la invención no está limitada a estos ejemplos específicos. Más bien, la invención que va a protegerse se define por las reivindicaciones adjuntas.

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

(i) SOLICITANTE: Donald I. Stimpson

Julian Gordon

Joanell V. Hoijer

(ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: PROCEDIMIENTO DE GUÍA DE ONDAS ÓPTICA DIFUSORA DE LA LUZ PARA DETECTAR ACONTECIMIENTOS DE UNIÓN ESPECÍFICA

(iii) NÚMERO de SECUENCIAS: 21

(iv) DIRECCIÓN DE CORRESPONDENCIA:

(A) DESTINATARIO: Abbott Laboratories

(B) CALLE: One Abbott Park Road

(C) CIUDAD: Abbott Park

(D) ESTADO: Illinois

(E) PAÍS: EE.UU.

(F) CÓDIGO POSTAL: 60064-3500

(v) FORMA LEGIBLE POR ORDENADOR:

(A) TIPO DE MEDIO: Disquete

(B) ORDENADOR: IBM PC compatible

(C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS

(D) SOFTWARE: MS Word/Wordperfect

(vi) PRESENTE FECHA DE SOLICITUD:

(A) NÚMERO DE SOLICITUD:

(B) FECHA DE PRESENTACIÓN:

(C) CLASIFICACIÓN:

(viii) INFORMACIÓN DEL APODERADO/AGENTE:

(A) NOMBRE: Thomas D. Brainard

(B) NÚMERO DE REGISTRO: 32.459

(C) NÚMERO DE EXPEDIENTE: 5603.US.01

(ix) INFORMACIÓN DE TELECOMUNICACIÓN:

(A) TELÉFONO: 708/937-4884

(B) TELEFAX: 708/938-2623

(C) TÉLEX:

(2) INFORMACIÓN DE SEC ID NO:1:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIAS:

(A) LONGITUD: 15 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) NATURALEZA DE LAS CADENAS: única

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN sintético

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: amina en 3'

(B) LOCALIZACIÓN: 15

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO:1:

TATCATCTTT GGTGT 15

(2) INFORMACIÓN DE SEC ID NO:2:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIAS:

(A) LONGITUD: 15 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) NATURALEZA DE LAS CADENAS: única

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN sintético

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: amina en 3'

(B) LOCALIZACIÓN: 15

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO:2:

AATATCATTG GTGTT 15

(2) INFORMACIÓN DE SEC ID NO:3:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIAS:

(A) LONGITUD: 15 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) NATURALEZA DE LAS CADENAS: única

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN sintético

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: amina en 3'

(B) LOCALIZACIÓN: 15

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO:3:

AGTGGAGGTC AACGA 15

(2) INFORMACIÓN DE SEC ID NO:4:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIAS:

(A) LONGITUD: 15 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) NATURALEZA DE LAS CADENAS: única

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN sintético

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: amina en 3'

(B) LOCALIZACIÓN: 15

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO:4:

AGTCGAGATC AACGA 15

(2) INFORMACIÓN DE SEC ID NO:5:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIAS:

(A) LONGITUD: 15 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) NATURALEZA DE LAS CADENAS: única

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN sintético

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: amina en 3'

(B) LOCALIZACIÓN: 15

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO:5:

AGGTCAACGA CCAAG 15

(2) INFORMACIÓN DE SEC ID NO:6:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIAS:

(A) LONGITUD: 15 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) NATURALEZA DE LAS CADENAS: única

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN sintético

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: amina en 3'

(B) LOCALIZACIÓN: 15

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO:6:

AGGTCAATCAGCAAG 15

(2) INFORMACIÓN DE SEC ID NO:7:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIAS:

(A) LONGITUD: 15 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) NATURALEZA DE LAS CADENAS: única

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN sintético

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: amina en 3'

(B) LOCALIZACIÓN: 15

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO:7:

TGGAGATCAA TGAGC 15

(2) INFORMACIÓN DE SEC ID NO:8:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIAS:

(A) LONGITUD: 15 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) NATURALEZA DE LAS CADENAS: única

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN sintético

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: amina en 3'

(B) LOCALIZACIÓN: 15

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO:8:

TGGAGATCAA CGAGC 15

(2) INFORMACIÓN DE SEC ID NO:9:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIAS:

(A) LONGITUD: 15 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) NATURALEZA DE LAS CADENAS: única

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN sintético

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: amina en 3'

(B) LOCALIZACIÓN: 15

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO:9:

TGGAGGTCAA TGAGC 15

(2) INFORMACIÓN DE SEC ID NO:10:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIAS:

(A) LONGITUD: 15 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) NATURALEZA DE LAS CADENAS: única

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN sintético

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: biotina en 3'

(B) LOCALIZACIÓN: 15

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO:10:

ACACCAAAGA TGATA 15

(2) INFORMACIÓN DE SEC ID NO:11:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIAS:

(A) LONGITUD: 15 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) NATURALEZA DE LAS CADENAS: única

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN sintético

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: biotina en 3'

(B) LOCALIZACIÓN: 15

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO:11:

AACACCAATG ATATT 15

(2) INFORMACIÓN DE SEC ID NO:12:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIAS:

(A) LONGITUD: 15 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) NATURALEZA DE LAS CADENAS: única

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN sintético

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: biotina en 3'

(B) LOCALIZACIÓN: 15

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO:12:

TCGTTGACCT CCACT 15

(2) INFORMACIÓN DE SEC ID NO:13:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIAS:

(A) LONGITUD: 15 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) NATURALEZA DE LAS CADENAS: única

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN sintético

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: biotina en 3'

(B) LOCALIZACIÓN: 15

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO:13:

TCGTTGATCT CCACT 15

(2) INFORMACIÓN DE SEC ID NO:14:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIAS:

(A) LONGITUD: 15 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) NATURALEZA DE LAS CADENAS: única

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN sintético

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: biotina en 3'

(B) LOCALIZACIÓN: 15

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO:14:

CTTGCTCGTT GACCT 15

(2) INFORMACIÓN DE SEC ID NO:15:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIAS:

(A) LONGITUD: 15 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) NATURALEZA DE LAS CADENAS: única

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN sintético

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: biotina en 3'

(B) LOCALIZACIÓN: 15

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO:15:

CTTGCTCATT GACCT 15

(2) INFORMACIÓN DE SEC ID NO:16:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIAS:

(A) LONGITUD: 15 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) NATURALEZA DE LAS CADENAS: única

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN sintético

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: biotina en 3'

(B) LOCALIZACIÓN: 15

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO:16:

GCTCATTGAT CTCCA 15

(2) INFORMACIÓN DE SEC ID NO:17:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIAS:

(A) LONGITUD: 15 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) NATURALEZA DE LAS CADENAS: única

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN sintético

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: biotina en 3'

(B) LOCALIZACIÓN: 15

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO:27:

GCTCGTTGAT CTCCA 15

(2) INFORMACIÓN DE SEC ID NO:18:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIAS:

(A) LONGITUD: 15 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) NATURALEZA DE LAS CADENAS: única

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN sintético

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: biotina en 3'

(B) LOCALIZACIÓN: 15

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO:18:

GCTCATTGAC CTCCA 15

(2) INFORMACIÓN DE SEC ID NO:19:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIAS:

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) NATURALEZA DE LAS CADENAS: única

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN sintético

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: biotina en 5'

(B) LOCALIZACIÓN: 1

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: hapteno de fluoresceína en 3'

(B) LOCALIZACIÓN: 24

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO: 19:

GGACACGGAC ACGGACACGG ACAC 24

(2) INFORMACIÓN DE SEC ID NO:20:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIAS:

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) NATURALEZA DE LAS CADENAS: única

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN sintético

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: biotina en 5'

(B) LOCALIZACIÓN: 1

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: hapteno de quinolina en 3'

(B) LOCALIZACIÓN: 24

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO:20:

GGACACGGAC ACGGACACGG ACAC 24

(2) INFORMACIÓN DE SEC ID NO:21:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIAS:

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) NATURALEZA DE LAS CADENAS: única

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN sintético

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: biotina en 5'

(B) LOCALIZACIÓN: 1

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: hapteno de adamantano en 3'

(B) LOCALIZACIÓN: 24

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO:21:

GGACACGGAC ACGGACACGG ACAC 24

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para determinar la secuencia de nucleótidos de segmento de ácido nucleico desconocido o para distinguir dos secuencias de nucleótidos estrechamente relacionadas, comprendiendo el procedimiento:

(a) proporcionar un dispositivo de guía de ondas, comprendiendo el dispositivo de guía de ondas (i) un elemento transparente que tiene un índice de refracción superior al de la muestra de fluido; (ii) un borde receptor de la luz; y (iii) una superficie reactiva que comprende una pluralidad de sitios que tienen oligonucleótido inmovilizado sobre la misma, definiendo dichos sitios una matriz de oligonucleótidos que tiene diferentes secuencias para hibridarse con el ácido nucleico desconocido, no teniendo otras porciones de no sitio de la superficie de dicho elemento oligonucleótidos inmovilizados sobres la mismas;

(b) poner en contacto la superficie reactiva bajo condiciones de hibridación con dicho ácido nucleico desconocido en el que dicho ácido nucleico desconocido, tanto directamente como mediante pares de unión análogos intermedios si se desea, está marcado con una marca difusora de la luz; formándose así complejos de marca difusora de la luz unidos a aquellos sitios de la superficie reactiva que son complementarios a la secuencia del ácido nucleico desconocido;

(c) iluminar el borde receptor de la luz de la guía de ondas con luz eficaz para crear reflexión interna total dentro de la guía de ondas, iluminándose así simultáneamente toda la superficie reactiva;

(d) recoger sustancialmente simultáneamente la luz difundida, si la hay, de cada sitio y de porciones de no sitio de dicha superficie;

(e) comparar el grado de difusión de la luz en cada sitio con tanto (i) el grado de difusión de la luz en una porción de no sitio; como (ii) el grado de difusión de la luz en otro sitio; y

(f) que comprende además aumentar incrementalmente las condiciones de rigurosidad en la superficie reactiva del dispositivo de guía de ondas parar iniciar la disociación de ácido nucleico unido de los sitios y repetir las etapas (d) y (e) en cada incremento;

por lo que diferencias de un único par de bases entre los oligonucleótidos y el ácido nucleico desconocido pueden distinguirse de apareamientos perfectos por diferencias en las propiedades de disociación.

2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicha secuencia de ácidos nucleicos del analito incluye un indicador de haptenos y el miembro de unión específica unido a dicha marca difusora de la luz es específico para dicho indicador de haptenos.

3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho procedimiento comprende además un segundo elemento transparente conectado a dicho primer elemento para formar un canal capilar bidimensional entre ellos de forma que la superficie reactiva se forme en el canal.

4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicha marca difusora de la luz es una partícula seleccionada del grupo que consiste en oro coloidal, selenio coloidal y látex.

5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la recogida sustancialmente simultánea de luz difundida de una pluralidad de sitios se lleva a cabo visualmente por el ojo y el cerebro de un observador.

6. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la recogida sustancialmente simultánea de luz difundida se lleva a cabo por una matriz de dispositivos fotodetectores seleccionados del grupo que consiste en fotodiodos, dispositivos de carga acoplada, fototransistores, fotorresistores y fotomultiplicadores.

7. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicha marca difusora de la luz está unida a dicho primer miembro de unión específica de un segundo par de unión análogo mediante un par de unión análogo intermedio seleccionado del grupo que consiste en: hapteno y anticuerpo dirigido contra hapteno; biotina y avidina o estreptavidina; y secuencias de ácidos nucleicos complementarios.

8. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que las condiciones de rigurosidad se aumentan incrementalmente mediante aumentos escalonados de temperatura.

9. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que las condiciones de rigurosidad se aumentan incrementalmente mediante aumentos escalonados de un agente de dilución que disminuye la fuerza iónica de la disolución.

10. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho dispositivo de guía de ondas está provisto de una superficie de reacción que tiene un recubrimiento de proteína metasoluble.

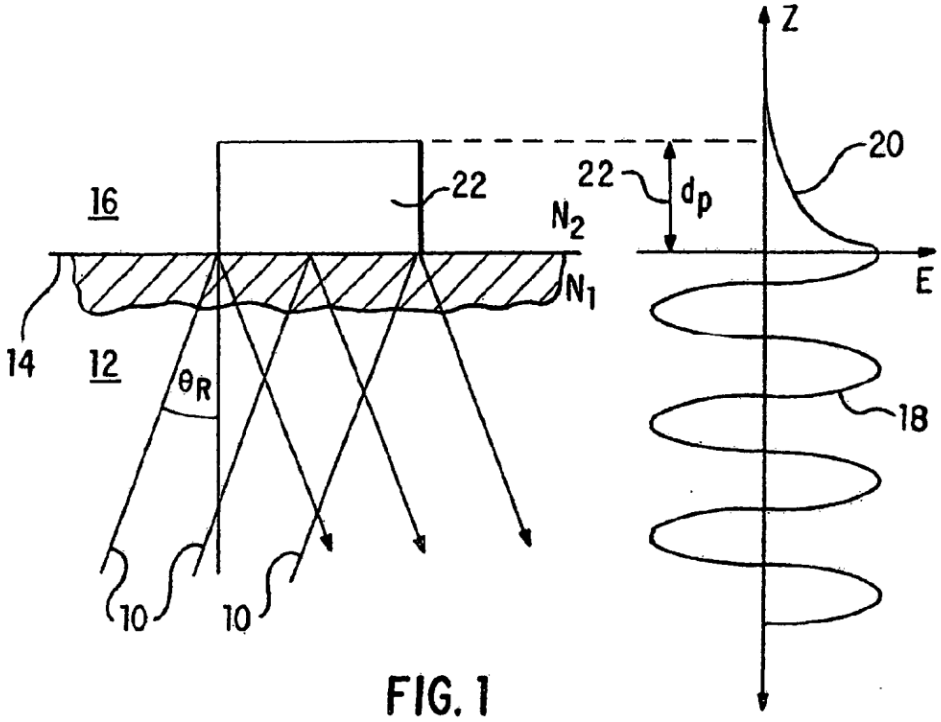

Z
20
22
22
d_p
16
N_2
E
N_1
14
12
θ_R
18
10
10

FIG. 1

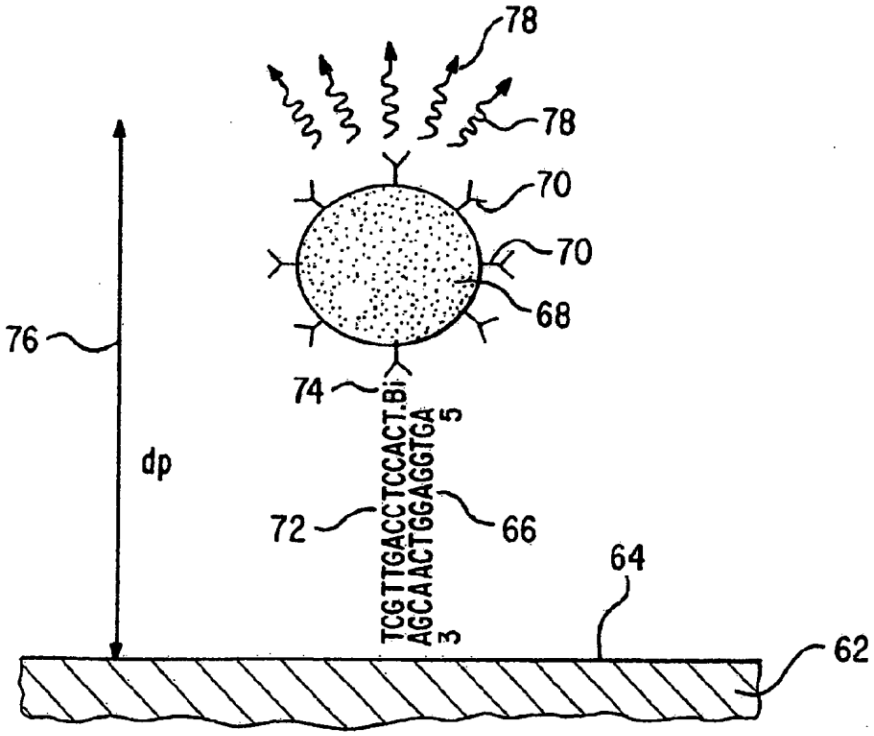

78
78
70
70
68
76
74
TCGTTGACCTCCACT.Bi
AGCAACTGGAGGTGA
5
3
dp
72
66
64
62

FIG. 3

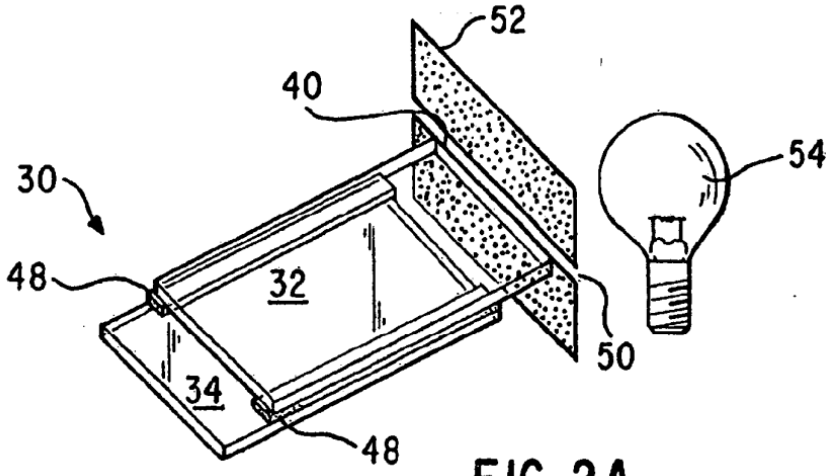


FIG. 2A

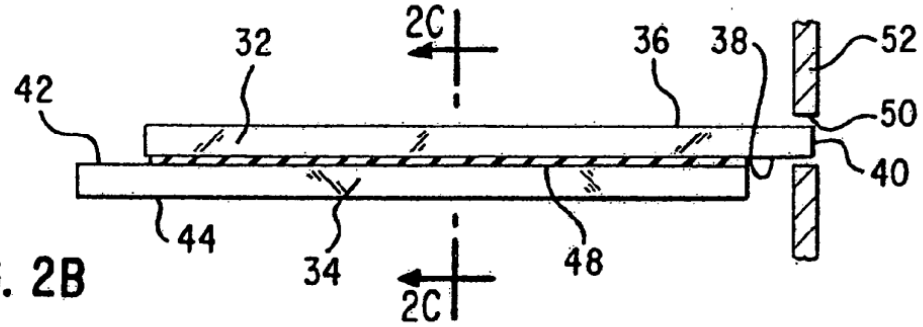


FIG. 2B

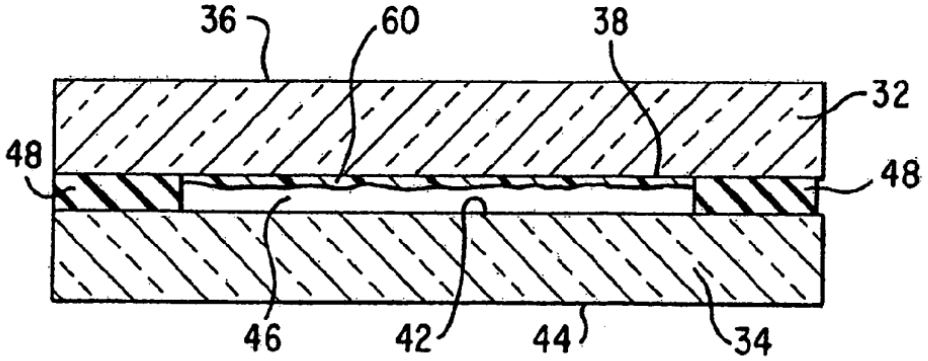


FIG. 2C

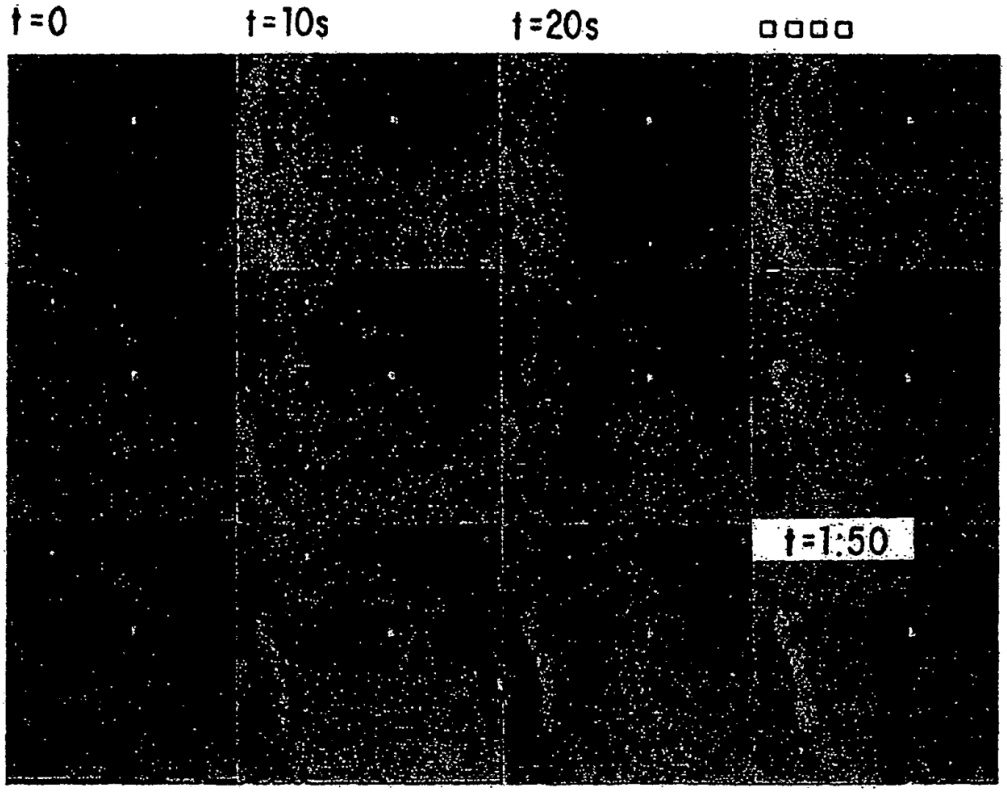


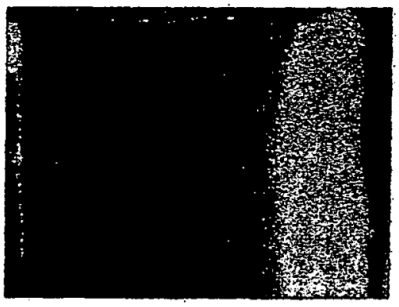
FIG.4

t=0 (relleno)

FIG.5A

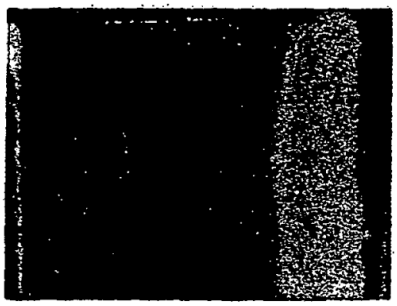
t= 1 segundo

FIG.5B



t= 5 segundos

FIG.5C



t= 20 segundos

FIG.5D

FIG.6A

FIG.6B

FIG.6C

FIG.6D

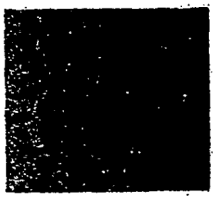


FIG.6E

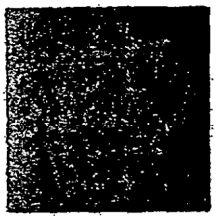


FIG.6F

FIG.7A

FIG.7B

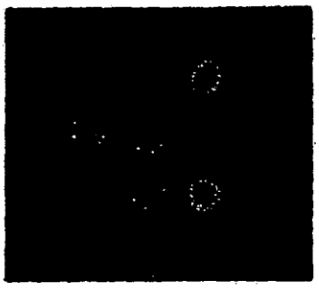


FIG.7C

FIG.7D

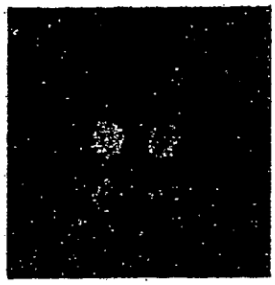


FIG.7E

FIG.7F

FIG.7G

FIG.7H

FIG.7I

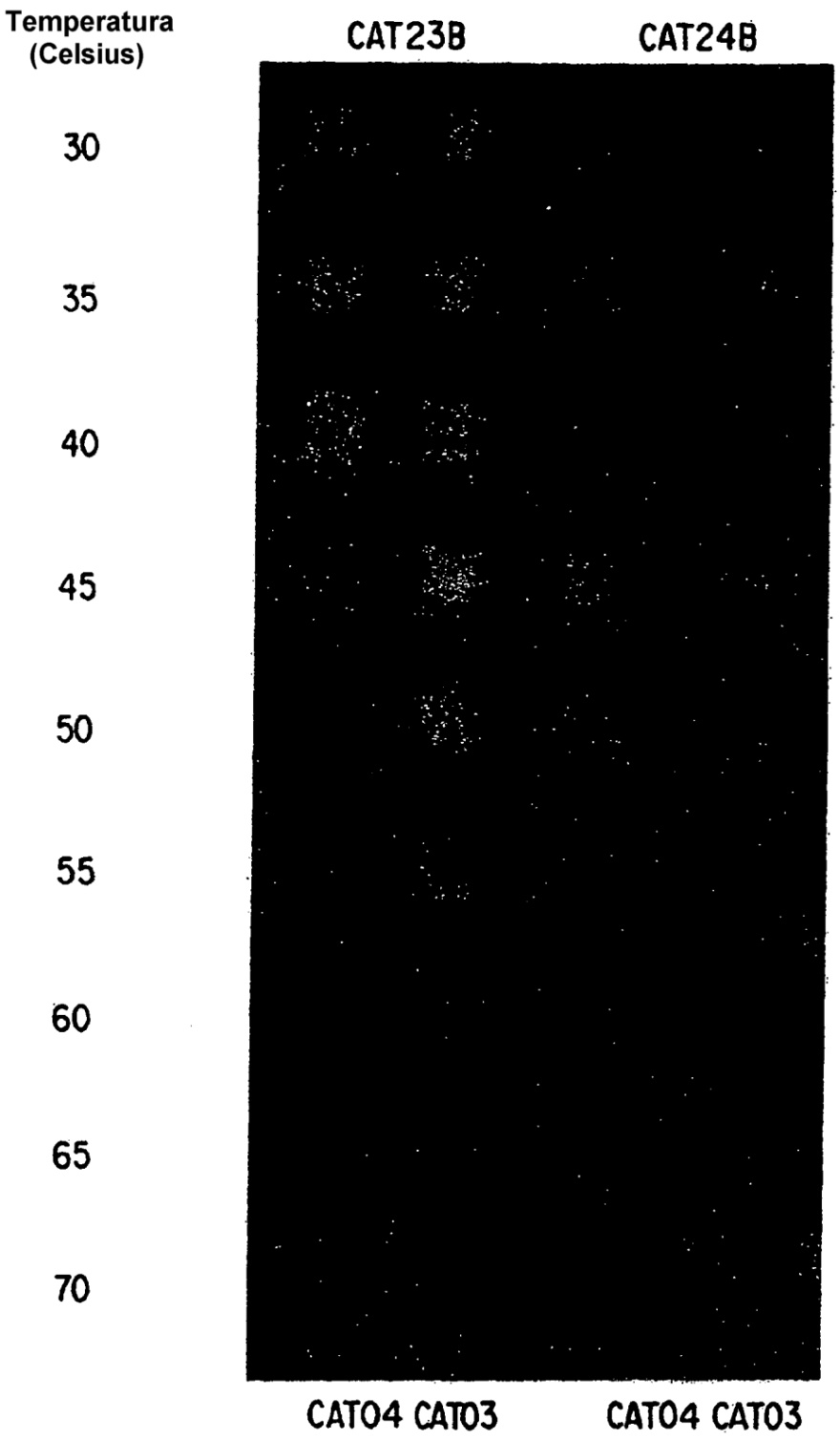

Temperatura
(Celsius)
CAT23B
CAT24B
30
35
40
45
50
55
60
65
70
CAT04 CAT03
CAT04 CAT03

FIG.8A

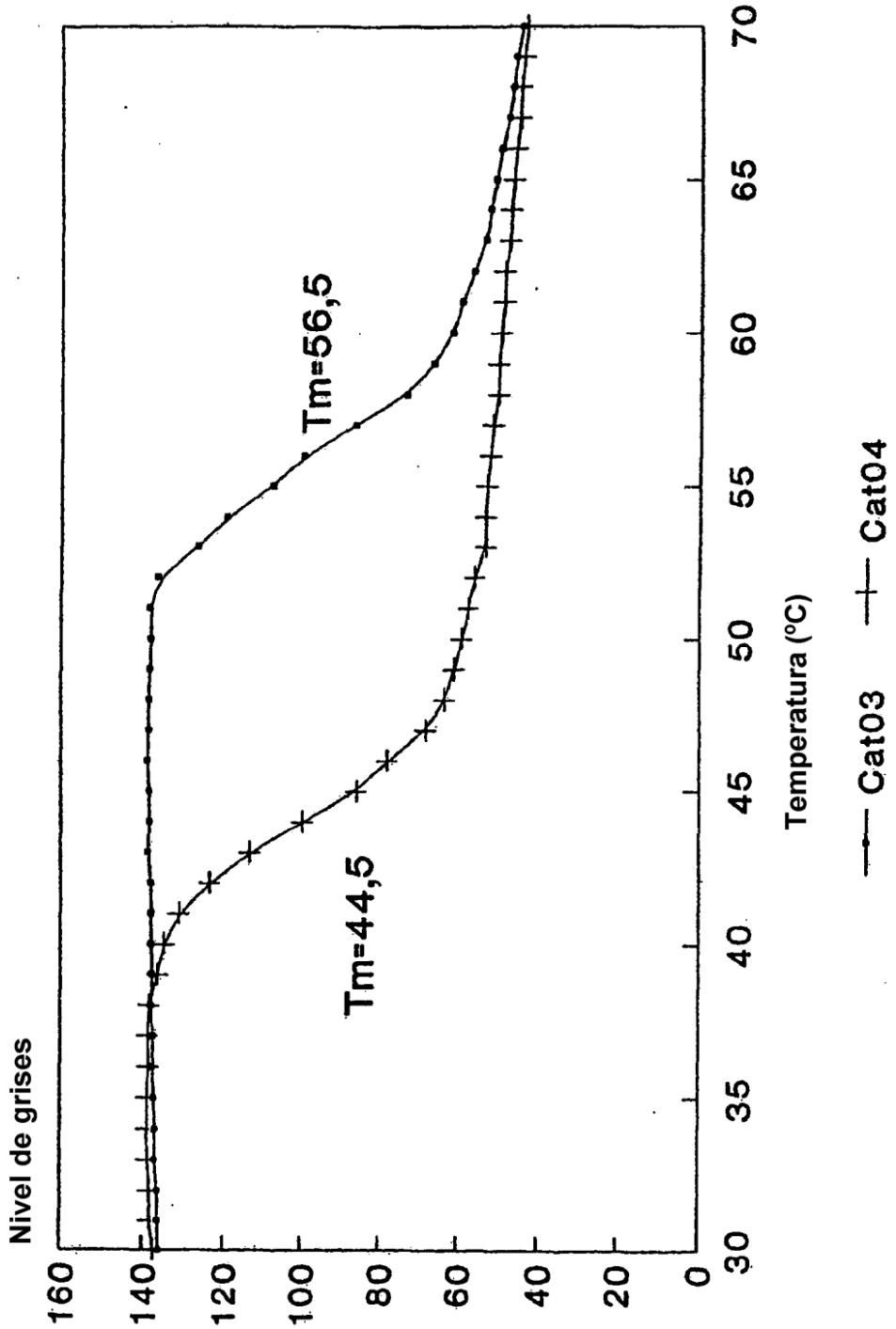

Nivel de grises
160
140
120
100
80
60
40
20
0
30
35
40
45
50
55
60
65
70
Temperatura (ºC)
Tm=44,5
Tm=56,5
Cat03
Cat04

Fig. 8B

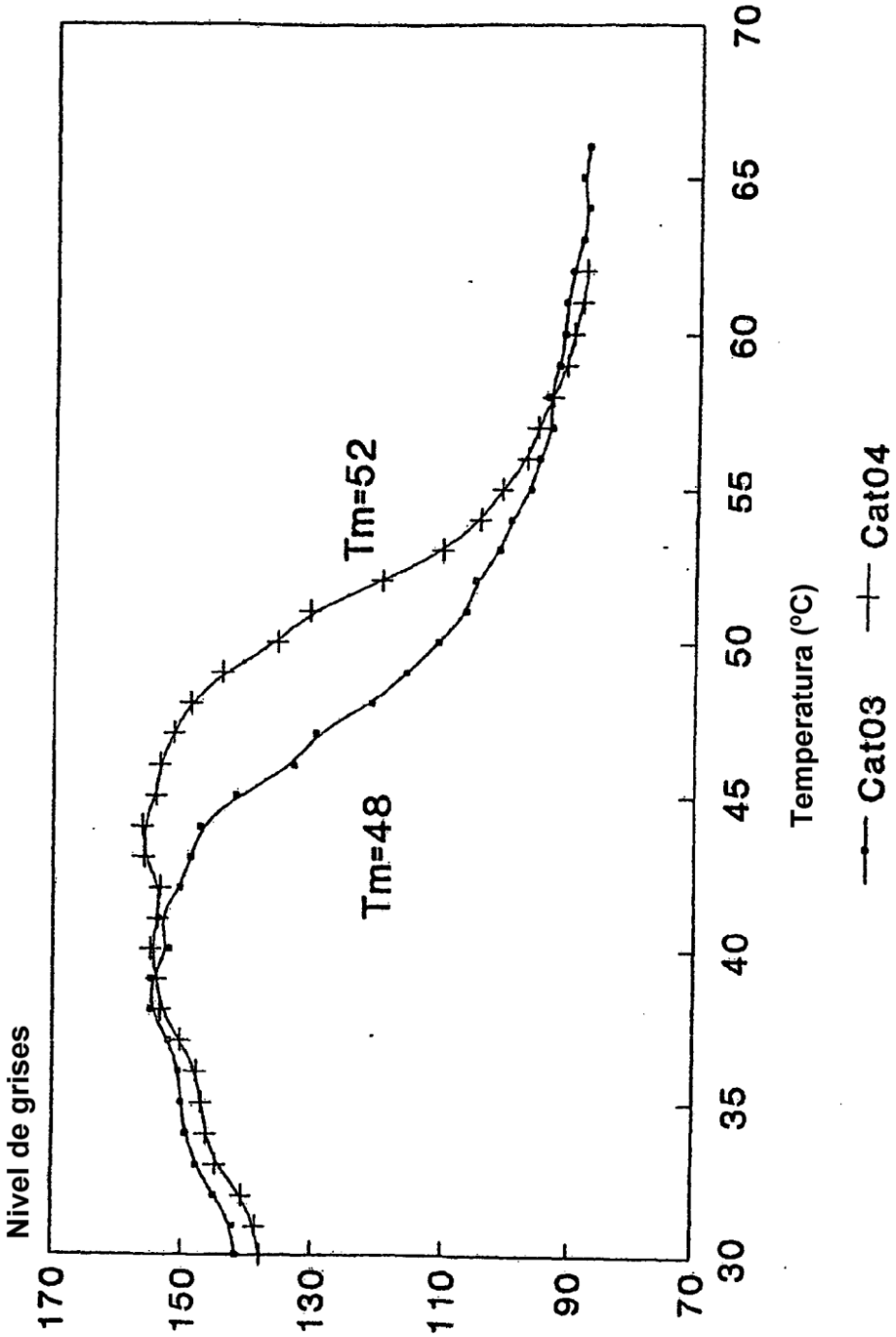

Nivel de grises
170
150
130
110
90
70
30
35
40
45
50
55
60
65
70
Temperatura (ºC)
Tm=52
Tm=48
Cat03
Cat04

Fig. 8C

C=0

FIG.9A

C=0,4 nM

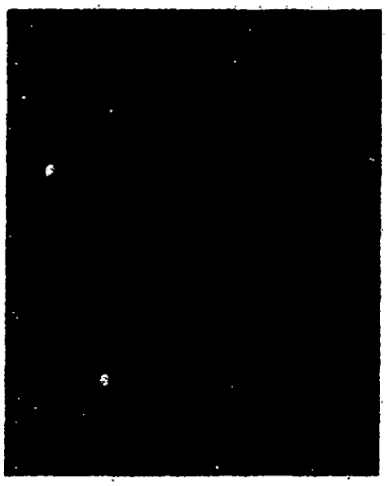


FIG.9B

C=4 nM

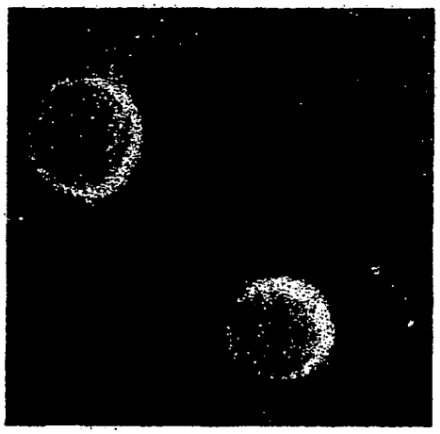


FIG.9C

C=40 nM

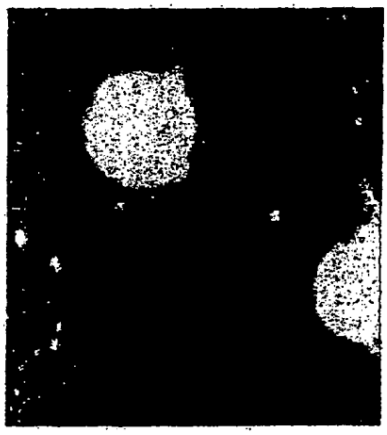


FIG.9D

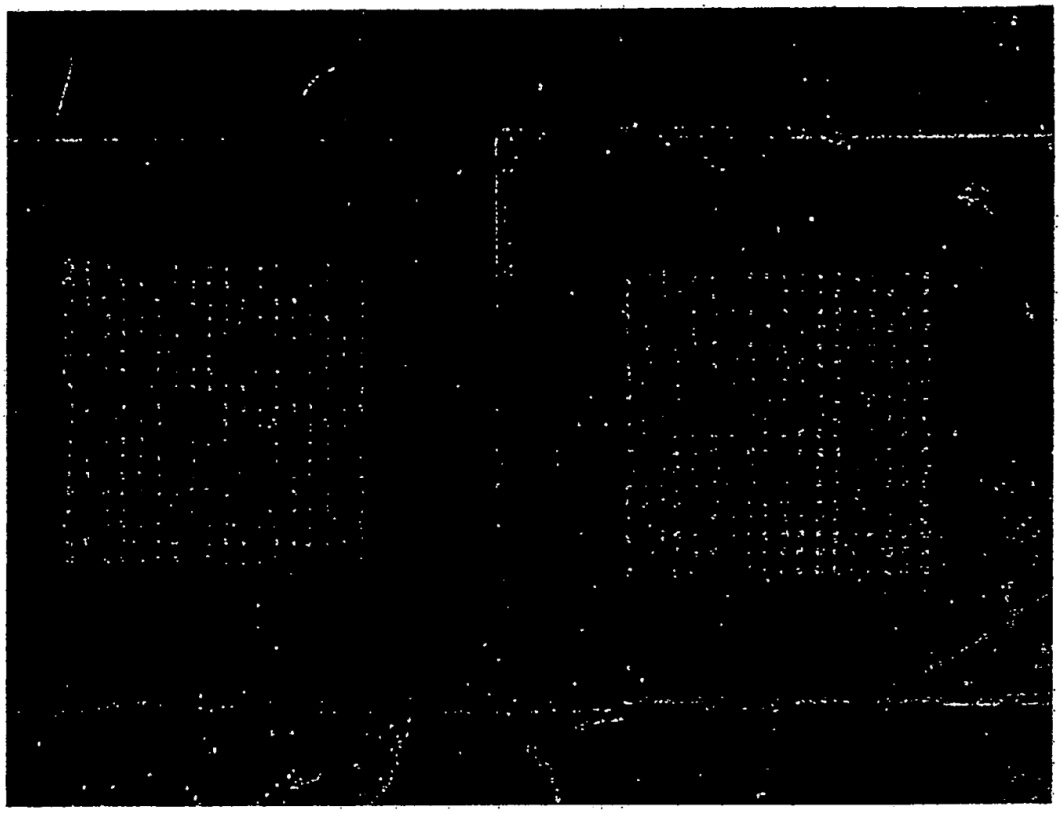


FIG.10

FIG.11A

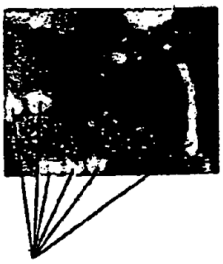
FIG.11B

FIG.11C

FIG.11D

FIG.11E

FIG.11F



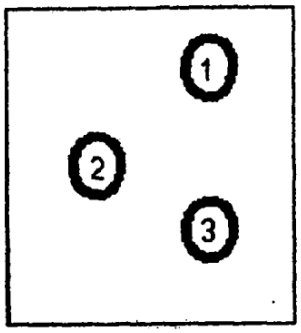


FIG.12A

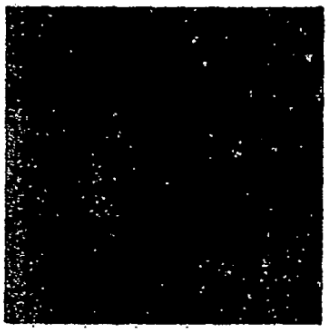


FIG.12B

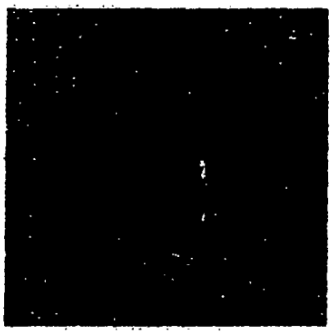


FIG.12D

FIG.12C

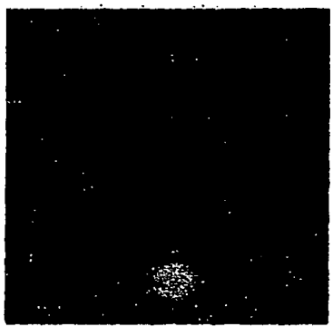


FIG.12E