



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 359 172**

51 Int. Cl.:

B01L 3/00 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07729737 .2**

96 Fecha de presentación : **31.05.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **2035143**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **18.03.2009**

54 Título: **Procedimiento para el análisis de ácidos nucleicos amplificados.**

30 Prioridad: **19.06.2006 DE 10 2006 028 101**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
19.05.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
19.05.2011

73 Titular/es: **SIEMENS AKTIENGESELLSCHAFT**
Wittelsbacherplatz 2
80333 München, DE

72 Inventor/es: **Gumbrecht, Walter;**
Paulicka, Peter y
Stanzel, Manfred

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

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

Procedimiento para el análisis de ácidos nucleicos amplificados.

- 5 La invención se refiere a un procedimiento para llevar a cabo el análisis de ácidos nucleicos amplificados en un dispositivo microfluídico. De igual modo, la invención se refiere a una agrupación para llevar a cabo la realización de un procedimiento de este tipo.

Estado de la técnica.

- 10 El análisis de ADN por medio de la hibridación constituye un procedimiento conocido en la biología molecular (véase la publicación "Gentechnische Methoden", G.Gassen y G.Schrimpf, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, 1999, paginas 243 hasta 261). Esta técnica juega un papel importante para llevar a cabo la detección de ácidos nucleicos específicos, por ejemplo en el diagnóstico molecular de mutaciones puntuales individuales (single nucleotide polymorphism, SNP). En este caso, es empleado un oligonucleótido sonda, que está constituido por una secuencia de, por ejemplo, aproximadamente 20 nucleótidos, con objeto de enlazar a los ácidos nucleicos, que se diferencian únicamente en un solo nucleótido. Debe indicarse que, en el presente contexto, el concepto de "ácidos nucleicos" debe abarcar una secuencia de ácidos nucleicos, por ejemplo una secuencia de ADN o una secuencia de ARN. Cuando se lleva a cabo una elección adecuada de las condiciones para la hibridación (especialmente la temperatura y la concentración salina), el oligonucleótido sonda enlaza de forma selectiva a las variantes no mutadas del ácido nucleico, mientras que las variantes del ácido nucleico, que presentan mutación puntual individual, no son enlazadas o únicamente son enlazadas débilmente. De este modo, es posible una detección de las mutaciones puntuales individuales. Como consecuencia de la pequeña diferencia entre la energía de enlace de la variante sin mutación (es decir del tipo natural) y del mutante, las condiciones de la reacción deben cumplir parámetros exactos en lo que se refiere a la temperatura así como a la composición y a la concentración salina de la solución de la reacción.

- 25 Puesto que los correspondientes ácidos nucleicos en el material de muestra (por ejemplo la sangre) no están disponibles en la mayoría de las ocasiones en cantidades o bien en concentraciones suficientes, es necesario llevar a cabo una amplificación de los ácidos nucleicos, que deben ser analizados. Esta amplificación puede ser llevada a cabo, de manera específica para la secuencia, por medio de diversos procedimientos, que son conocidos en la biología molecular, por ejemplo por medio de la amplificación por desplazamiento patrón ADS (strand displacement amplification), que ha sido descrito en la publicación de los autores Walker, GT, et al., "Strand Displacement Amplification, an isothermal, invitro DNA Amplification Technique", Nucleic Acids Research, 1992, 20, 1961 hasta 96; con ayuda de la amplificación por medio de transcripción TMA (transcription mediated amplification), que ha sido descrita en www.gen-probe.com/sci_tec/tea.htm; o por medio de la reacción en cadena de polimerasa (polymerase chain reaction, RCP), que está descrita, entre otras, en la patente norteamericana US 4 683 195. En este caso constituye un problema el que la composición de la solución de la reacción para la reacción de amplificación y, por lo tanto, el "producto de la amplificación en bruto", no presenta la composición y, de manera especial, no presenta la concentración salina, que son necesarias para llevar a cabo la hibridación. Por otra parte, con objeto de llevar a cabo un diagnóstico molecular, puede ser necesario efectuar una separación selectiva de los híbridos formados en un proceso subsiguiente (fusión), por ejemplo por medio de un aumento de la temperatura. Con objeto de posibilitar los procesos de hibridación con elevado rendimiento se requiere, entre otras cosas, una elevada concentración en cationes monovalentes (por ejemplo iones Na^+). Los cationes monovalentes favorecen el enlace de la estructura de doble hélice con ocasión de la reacción de hibridación.

- 45 Sin embargo, las cargas de reacción para llevar a cabo las reacciones de amplificación, por ejemplo una reacción RCP, contienen una baja concentración en cationes monovalentes. Por otra parte, los tampones para la reacción RCP presenta una concentración relativamente elevada (algunos mM) en iones Mg^{2+} , que tienen un efecto negativo con ocasión de la hibridación en sondas de detección sobre el enlace de las sondas y de las hebras complementarias, para formar los híbridos completos, pueden provocar una prolongación de las sondas como consecuencia de la actividad polimerasa y pueden provocar una estabilización de las hebras dobles con ocasión de un proceso de fusión subsiguiente, y pueden dificultar la fusión, lo cual conduce a curvas de fusión "difusas" a elevadas temperaturas.

- 50 De conformidad con el estado de la técnica, los productos de la amplificación son purificados, por este motivo, como paso previo a la reacción de hibridación, siendo eliminados en este caso todos los componentes perjudiciales para una reacción de hibridación (entre otros la polimerasa, los cebadores, los nucleótidos, las sales) y siendo aumentada la concentración en iones Na^+ . Este proceso de purificación es relativamente complicado y se lleva a cabo, de manera usual, por medio de un enlace inespecífico de los ácidos nucleicos sobre una fase sólida (por medio de las denominadas columnas de purificación), lavado del producto de la amplificación en la columna y disolución de la fase sólida o por medio de una extracción con fenol/cloroformo o según procedimientos similares. De manera especial, con ocasión de la realización de los análisis de los ácidos nucleicos en dispositivos microfluídicos, en los

que se desarrollan todos los procesos de reacción de forma integrada y en un pequeño recinto, no entran en consideración los procedimientos de purificación, que son usuales en el estado de la técnica, puesto que su realización es muy complicada bajo estas circunstancias.

- 5 Los autores Liu et al (Anal. Chem. 2004, 76, 1824-1831) divulgan un procedimiento para llevar a cabo el análisis de los ácidos nucleicos en un dispositivo microfluidico, que comprende las etapas de llevar a cabo la amplificación de los ácidos nucleicos en una primera cámara del dispositivo microfluídico, la puesta en contacto de los ácidos nucleicos amplificados con un tampón de la hibridación en una segunda cámara en el dispositivo microfluídico y la hibridación de los ácidos nucleicos amplificados en, al menos, un oligonucleótido sonda.

Planteamiento de la tarea.

- 10 La tarea de la presente invención consiste en proporcionar un procedimiento sencillo y económico, que posibilite la elaboración eficiente de ácidos nucleicos amplificados para otras etapas del procedimiento, cuyo procedimiento no exija etapas adicionales de enlace o de lavado y que pueda ser realizado con un sencillo concepto de fluídica.

Descripción de la invención.

- 15 Expresado de una manera general, la idea inventiva consiste en llevar a cabo la amplificación de una muestra con ácidos nucleicos y en combinar la muestra, que contiene el producto de la amplificación en bruto, con un aditivo adecuado, con objeto de llevar a cabo la elaboración del producto de la amplificación en bruto para otras etapas del procedimiento, por ejemplo para otras etapas de análisis. Por medio del aporte del aditivo se evita la necesidad de tener que purificar los ácidos nucleicos amplificados. Este procedimiento es especialmente adecuado para ser empleado en dispositivos microfluídicos, en los cuales son preferentes desarrollo de procedimientos no complicados con un sencillo concepto de fluídica. De conformidad con la invención, el aditivo presenta cationes monovalentes y un agente enlazante de los iones Mg^{2+} . Un aditivo de ese tipo es especialmente adecuado para llevar a cabo la elaboración de ácidos nucleicos amplificados destinados a una hibridación subsiguiente sobre oligonucleótidos sonda.

- 25 De conformidad con la invención, se resuelve la tarea, de manera especial, por medio del procedimiento de conformidad con la reivindicación 1. En las reivindicaciones de procedimiento dependientes están indicados desarrollos ventajosos. Un sistema correspondiente, para llevar a cabo la realización del procedimiento, de conformidad con la invención, constituye el objeto de la reivindicación 16. Desarrollos de este sistema están indicados en las reivindicaciones materiales dependientes.

- 30 De conformidad con la presente invención se proporciona, de manera especial, un procedimiento para llevar a cabo el análisis de ácidos nucleicos amplificados en un dispositivo microfluídico, cuyo procedimiento presenta las etapas siguientes:

- a) la amplificación de los ácidos nucleicos en una primera cámara en el dispositivo microfluídico;
- b) la puesta en contacto de los ácidos nucleicos amplificados con un aditivo, adecuado para llevar a cabo la elaboración de los ácidos nucleicos amplificados, destinados a una hibridación subsiguiente sobre oligonucleótidos sonda, cuyo aditivo presenta:
- 35 i.) cationes monovalentes y
- ii.) un agente enlazante de los iones Mg^{2+} ,
- estando previsto el aditivo, acumulado en forma de reactivo seco, en una segunda cámara en el dispositivo microfluídico y es extraído en forma de reactivo seco;
- 40 c) la hibridación de los ácidos nucleicos amplificados sobre, al menos, un oligonucleótido sonda, siendo empleada para llevar a cabo la reacción de hibridación una mezcla constituida por el producto de la amplificación en bruto y por el aditivo.

- 45 El concepto de "microfluídico" designa aquellos procedimientos, que abarcan la manipulación de fluidos con volúmenes a escala de microlitro. De manera preferente, el dispositivo microfluídico está configurado en forma de cartucho, es decir en forma de una estructura plana, que presenta la forma de una tarjeta con rehundidos configurados en la misma, que forman canales y cámaras o bien cavidades, a través de las cuales pueden ser movidos fluidos de conformidad con determinadas secuencias de la reacción o esquemas.

Los cationes monovalentes abarcan, por ejemplo, el Li^+ , el Na^+ , el K^+ , y se presentan en el aditivo, de conformidad

con la invención, de manera preferente, en forma de iones Na^+ . Se entenderá por un agente enlazante de los iones Mg^{2+} , todos aquellos productos que enlacen a los iones Mg^{2+} , de manera especial los formadores de complejo, por ejemplo los formadores de complejos de quelato tales como el EGTA o el EDTA. De manera preferente el aditivo, que es empleado en el procedimiento de conformidad con la invención, presenta EDTA. Por otra parte, el aditivo

5 presenta, de manera preferente, un agente aglutinante, por ejemplo la polivinilpirrolidona. De la misma manera, pueden estar previstos otros productos auxiliares, por ejemplo sustancias tampón, productos tensioactivos o similares.

El aditivo está previsto y está acumulado de manera estable al almacenamiento en la segunda cámara, en forma de reactivo seco.

- 10 De manera preferente, los oligonucleótidos sonda están inmovilizados en forma de micromatriz sobre un soporte en el dispositivo microfluídico.

De conformidad con una primera forma de realización del procedimiento de la presente invención, el aditivo es transferido desde la segunda cámara hasta la primera cámara (la cámara para la amplificación), con objeto de poner en contacto el aditivo con los ácidos nucleicos amplificados. Cuando el aditivo esté previsto en la segunda cámara

15 en forma de reactivo seco, en esta forma de realización del procedimiento de conformidad con la invención, será conveniente disolver el aditivo con un disolvente, por ejemplo con agua. El aditivo disuelto puede ser transferido entonces desde la segunda cámara hasta la primera cámara, con objeto de llevar a cabo en la misma su mezcla con el producto de la amplificación en bruto.

De conformidad con una segunda forma de realización de la presente invención, los ácidos nucleicos amplificados en la solución de la reacción son transferidos, una vez realizada la amplificación, desde la primera cámara hasta la segunda cámara y, entonces, son conducidos en forma de mezcla con el aditivo hasta los oligonucleótidos sonda. Cuando el aditivo esté previsto en la segunda cámara en forma de reactivo seco, dicho aditivo podrá ser disuelto directamente por medio de la solución de la reacción con el producto de la amplificación en bruto, que es bombeada hasta la segunda cámara.

- 20 De conformidad con la invención es preferente, que la amplificación de los ácidos nucleicos tenga lugar por medio de una reacción RCP.

De conformidad con otro aspecto de la presente invención, se lleva a cabo entonces, de manera preferente, una detección de los ácidos nucleicos amplificados, que están hibridizados sobre los oligonucleótidos sonda. Esta detección puede ser llevada a cabo, por ejemplo, mediante el aprovechamiento de una etiqueta (de un marcado) de los ácidos nucleicos amplificados. La etiqueta puede ser una etiqueta óptica, pudiendo ser por ejemplo, también, una

30 etiqueta enzimática. Por medio de una etiqueta enzimática puede ser catalizada una reacción enzimática, que puede ser detectada, por ejemplo, de forma óptica o electroquímica. De conformidad con la invención se lleva a cabo, de manera preferente, una detección electroquímica, que comprende, de manera especialmente preferente, una medición de la corriente eléctrica intensificada por medio de una fluctuación Redox.

De manera especial, la invención se refiere, de igual modo, a un sistema para llevar a cabo la realización del procedimiento de conformidad con la invención, cuyo sistema está previsto en un dispositivo microfluídico y que comprende una primera cámara, que está proyectada para llevar a cabo la amplificación de los ácidos nucleicos, y una segunda cámara, en la que está acumulado, de forma estable al almacenamiento, el aditivo que ha sido descrito más arriba, pudiendo ser conectada la segunda cámara, en comunicación fluidica, con la primera cámara a través

40 de una conexión. De manera preferente, el sistema comprende un sistema en forma de micromatriz, que presenta oligonucleótidos sonda, que están inmovilizados sobre un soporte.

La conexión entre la primera cámara y la segunda cámara puede estar configurada en forma de un conducto o de un canal y, de manera preferente, puede ser abierta y cerrada de forma selectiva, por ejemplo por medio de una válvula de tal manera, que pueda ser transferido, de forma selectiva, fluido desde la primera cámara hasta la

45 segunda cámara, o desde la segunda cámara hasta la primera cámara. Por otra parte, pueden estar previstos medios para llevar a cabo la introducción de un disolvente en la segunda cámara, por ejemplo en forma de un canal de alimentación hacia la segunda cámara.

De manera preferente, están asociados con el sistema en forma de micromatriz medios para llevar a cabo la detección de los ácidos nucleicos hibridizados, cuyos medios posibiliten, por ejemplo, una detección óptica o electroquímica. Son especialmente preferentes los medios para llevar a cabo la detección electroquímica, que estén configurados para llevar a cabo la medición de corrientes eléctricas y/o de potenciales eléctricos. Los medios para llevar a cabo la detección óptica pueden abarcar, por ejemplo, una zona transparente del dispositivo, a través de la cual pueda llevarse a cabo, por ejemplo, la lectura de la absorción óptica o de la excitación y la detección de la excitación fluorescente. Los medios para llevar a cabo la detección electroquímica posibilitan, de manera preferente,

50 la medición de potenciales eléctricos y/o de corrientes eléctricas y pueden comprender un sistema de electrodos,

sobre el cual están inmovilizados los oligonucleótidos sonda sobre cada mancha de detección (colocados sobre la mancha), tal como se ha descrito, por ejemplo, en las publicaciones DE 101 26 341 o DE 100 58 397 A1. La publicación DE 101 11 457 divulga el empleo de reactivos, que están presentes en forma de reactivos secos en los dispositivos microfluídicos.

- 5 Por otra parte, pueden estar previstos en el dispositivo microfluídico medios correspondientes, por ejemplo en forma de cámara y/o de canales correspondientes, con objeto de llevar a cabo la acumulación y/o la transmisión de los reactivos para llevar a cabo la detección, por ejemplo enzima o sustrato enzimático.

- 10 De manera preferente, con la primera cámara (es decir con la cámara para la amplificación) están asignados medios para el aporte de calor y/o para la disipación del calor. Esos medios pueden comprender una zona con una conductibilidad térmica acrecentada en el dispositivo microfluídico que, por ejemplo, puede ser realizada si se configura el dispositivo microfluídico en esta zona con una pared especialmente delgada. Sin embargo, también puede imaginarse prever en el dispositivo microfluídico propiamente dicho un elemento generador o disipador del calor.

Ejemplo de realización.

- 15 Otras características y ventajas de la presente invención se desprenden de la descripción de las figuras que sigue, en relación con los ejemplos de realización y por medio de los dibujos adjuntos, que son únicamente ejemplificativos e ilustrativos.

Se muestra:

- En la figura 1 una representación en forma de diagrama del procedimiento de conformidad con la invención;
- 20 En la figura 2 una representación esquemática de un sistema para llevar a cabo la realización del procedentito de la invención, de conformidad con una primera forma de realización;
- En la figura 3 una representación esquemática de un sistema para llevar a cabo la realización del procedimiento de la invención, de conformidad con una segunda forma de realización;
- 25 En la figura 4 un detalle de una representación esquemática de un cartucho con el sistema de conformidad con la figura 2;
- En la figura 5 una representación comparativa de las curvas de fusión de los ácidos nucleicos hibridizados sin empleo del procedimiento de conformidad con la invención; y
- En la figura 6 una representación comparativa de las curvas de fusión de los ácidos nucleicos hibridizados con empleo del procedimiento de conformidad con la invención.
- 30 En la figura 1 está representada, de manera esquemática, la idea básica del procedimiento de conformidad con la invención para llevar a cabo el análisis de ácidos nucleicos en un dispositivo microfluídico. De conformidad con el estado de la técnica, se conoce llevar a cabo la purificación de los productos de la amplificación como paso previo a la hibridación. Esto representa un procedimiento substractivo, es decir que son eliminados los componentes perturbadores (polimerasas, cebadores, nucleótidos) a partir de la solución, que contiene el producto de la
- 35 amplificación en bruto. Por el contrario, el procedimiento de conformidad con la invención es un procedimiento aditivo, es decir que se aporta al producto de la amplificación en bruto un aditivo, que posibilita una reacción de hibridación mejorada o bien una separación subsiguiente mejorada, selectiva, de los híbridos. En este caso, no juega ningún papel el que el aditivo sea aportado al producto de la amplificación en bruto o que el producto de la amplificación en bruto sea aportado al aditivo, siendo lo decisivo, ante todo, que sea empleada para la reacción de la hibridación una mezcla constituida por el producto de la amplificación en bruto y por el aditivo.
- 40

- La figura 2 muestra un sistema para llevar a cabo la realización del procedimiento de conformidad con la invención, de acuerdo con una primera forma de realización con una primera cámara 10a y con una segunda cámara 20a. Una vez concluida la reacción de la amplificación se bombea el aditivo, que se encuentra en solución, desde la segunda cámara 20a (desde la cámara del aditivo) hasta la primera cámara 10a (la cámara para la reacción de amplificación).
- 45 Cuando el aditivo esté presente en forma de reactivo seco en la segunda cámara, se bombeará en primer lugar un disolvente (agua) en la segunda cámara 20a, con objeto de disolver al reactivo seco, a continuación se transfiere la solución hasta la primera cámara 10a (la cámara para la reacción de amplificación).

- La figura 3 muestra un sistema para llevar a cabo la realización del procedimiento de conformidad con la invención, de acuerdo con una segunda forma de realización con una primera cámara 10b y una segunda cámara 20b. En ese caso, se procede de manera inversa a lo que ocurre en el caso de la conducción del procedimiento, que ha sido
- 50

descrita más arriba: después de la reacción de amplificación se conduce el producto de la amplificación en bruto desde la primera cámara 10b (la cámara para la reacción de amplificación) hasta la segunda cámara 20b (la cámara del aditivo) y en dicha segunda cámara se mezcla con el aditivo. Cuando el aditivo esté presente en forma de reactivo seco, se llevará a cabo el bombeo del producto de la amplificación en bruto sobre el reactivo seco y se producirá su disolución.

En ambas forma de realización se transfiere entonces la mezcla, que está constituida por el producto de la amplificación en bruto y por el aditivo hasta la micromatriz para llevar a cabo la hibridación.

La figura 4 muestra un sistema de conformidad con la forma de realización, que está mostrada en la figura 2. La figura 4 muestra un cartucho 101, que está realizado a partir de un material sintético. En el cartucho 101 están previstos canales 130, 150, 160, cámaras 110, 120, 140 y rehundidos 121. El cartucho de material sintético puede estar configurado simplemente con canales, rehundidos y cámaras abiertos hacia arriba y pueden ser cubiertos con una lámina una vez distribuidas las manchas de los reactivos, con lo cual quedan cerrados los canales, los rehundidos y las cámaras, que han sido practicados en la superficie del cartucho. En la primera cámara 110, que puede ser rellenada a través del canal de alimentación 160, son amplificados ácidos nucleicos, por ejemplo por medio de una reacción RCP. Esto se lleva a cabo por inserción del cartucho en un dispositivo correspondiente de tal manera, que la cámara 110 pueda ser calentada y/o enfriada, por ejemplo, por medio de un elemento de tipo Peltier, que se encuentra en el dispositivo. El aditivo, que presenta EDTA y cloruro de sodio, se presenta en forma de reactivo seco en los rehundidos 121 en la segunda cámara 120, que está configurada en forma de canal. En uno de sus extremos, la cámara 120 puede ser obturada por medio de una válvula 122. Esta válvula puede estar configurada, por ejemplo, en forma de una simple válvula de estrangulación. Una vez verificada la reacción RCP se bombea agua en la cámara 120 y, de este modo, se disuelve el aditivo, que está acumulado en forma de reactivo seco. A continuación, se abre la válvula 122 y el aditivo disuelto puede ser bombeado ahora hasta la cámara para la amplificación 110. En dicha cámara se mezcla el aditivo disuelto con el producto de la amplificación en bruto y la mezcla es bombeada entonces, a través del canal 130, hasta la cámara para hibridación 140, en la que está prevista una micromatriz con oligonucleótidos sonda, que están inmovilizados sobre un soporte. Por medio de la elección adecuada de la fluídica, por ejemplo, la geometría o las velocidades de flujo, puede realizarse que sea transportado producto de amplificación no modificado, en primer lugar al comienzo del proceso de bombeo y que, solo después de un bombeo adicional, sean mezclados los aditivos, cada vez en cantidad creciente. De este modo, pueden ser bombeados, en caso dado de manera ventajosa, los aditivos hasta la cámara para la hibridación, con un gradiente de conservación creciente. En esta cámara puede tener lugar ahora la reacción de hibridación. La solución en exceso es alimentada a un recipiente para los productos residuales (waste) a través del canal de evacuación 150. Sobre el cartucho pueden estar previstas otras cámaras y otros canales (no mostrados), con objeto de tener preparados, por ejemplo, reactivos para llevar a cabo la detección de los caídos nucleicos enlazados, tales como, por ejemplo, enzima o sustrato enzimático.

Ejemplo.

Para llevar a cabo el registro de las curvas, que están mostradas en las figuras 5 y 6, se utilizó una tarjeta de material sintético colada por inyección, del tipo que está mostrado en la figura 4, en la que se han distribuido manchas de reactivo seco en los rehundidos 121. Con objeto de llevar a cabo la evaluación del procedimiento de conformidad con la invención, se efectuó la amplificación del tipo natural del gen del factor V (tipo natural FcV) y la mutación puntual individual del factor V Leiden (FcV-Leiden) por medio de una RCP, con objeto de obtener un producto de la RCP con un tamaño 168 bp. El producto génico del gen del factor V es una proteína de la cascada de la coagulación de la sangre, la mutación está descrita en la publicación de los autores Bertima et al., Nature, 1994; 369(6475):64-7.

La muestra de ADN se dispone en la primera cámara (cámara para la amplificación) 110 y se lleva a cabo la reacción RCP. El canal 120, con los rehundidos 121, se llena con agua y, de ese modo, el reactivo seco se disuelve. El aditivo, que está distribuido en forma de manchas de reactivo seco, está dimensionado de tal manera, que resulte una solución de EDTA 0,1M con NaCl 0,23M, cuando se sean aportados aproximadamente 25 µl de agua. De este modo, se garantiza una concentración suficiente de cationes monovalentes así como la minimización de la concentración del Mg^{2+} libre por medio de acomplejado. Por otra parte, se ha aportado al aditivo una substancia tampón de tal manera, que la solución sea ajustada a un valor del pH de pH = 8. Una vez concluida la reacción RCP, se mezcla el producto en bruto de la RCP (producto de la amplificación en bruto) con el aditivo por medio de la afluencia del aditivo disuelto en la primera cámara 110 y la mezcla es conducida ulteriormente hasta la cámara 140, en la que se encuentra un sistema en forma de micromatriz. Por medio del empleo de cebador biotinilizado en la reacción RCP, se obtienen productos de la RCP biotinilizados. Sobre el sistema en forma de micromatriz están distribuidas manchas de oligonucleótidos sonda, por medio de los cuales puede llevarse a cabo la discriminación entre el tipo natural FcV y FcV-Leiden. Los oligonucleótidos sonda deben ser elegidos de tal manera, que algunas manchas porten oligonucleótidos sonda, que estén perfectamente adaptados al tipo natural FcV, mientras que otras manchas porten oligonucleótidos sonda, que estén adaptados perfectamente al FcV-Leiden. Cuando se encuentren en el producto de la RCP, por ejemplo, secuencias del tipo natural FcV, entonces estas secuencias forman con las sondas del tipo natural un "perfect match" (un apareamiento perfecto de la hebra con la contrahebra) pero, sin

embargo, con las sondas FcV-Leiden forman un "single-base-mismatch" (un apareamiento individual erróneo de bases), que presenta una fuerza de enlace menor. Los productos de la RCP, que están enlazados con las moléculas de la sonda, son arrastrados por lavado por una solución de lavado, que contiene un enzima conjugado de estreptavidina (fosfatasa alcalina). El enzima se enlaza sobre los productos de la RCP biotinilizados, que están enlazados sobre el sistema en forma de micromatriz. Ahora es barrido el sistema en forma de micromatriz con una solución de sustrato, que contiene p-amino fenilfosfato. El p-aminofenilfosfato es convertido por la fosfatasa alcalina para dar p-aminofenol y el p-aminofenol formado es oxidado para dar quinonimina en una reacción Redox sobre electrodos del sistema en forma de micromatriz y es ciclado el par Redox, que está constituido por p-aminofenol / quinonimina, lo cual conduce sobre los electrodos a un aumento medible de la corriente eléctrica. Este aumento de la corriente eléctrica (dI/dT) es proporcional a la cantidad del producto de la RCP enlazado. Ahora se aumenta la temperatura de forma escalonada a través de un intervalo de temperaturas comprendido desde aproximadamente 20°C hasta aproximadamente 60°C, lo cual conduce, a temperaturas elevadas (aproximadamente a partir de los 25°C) a una fusión sucesiva de los híbridos, fundiéndose los productos de la RCP con mutaciones puntuales individuales, que presentan un apareamiento erróneo (mismatch) en el híbrido, de una manera claramente más rápida que los híbridos perfectamente pareados "perfect-match", en el ejemplo los híbridos del tipo natural. De este modo se genera una diferencia de señal, que puede ser detectada, entre el tipo natural (perfect match) y los mutantes puntuales individuales (single base mismatch). Se ha representado el resumen de varios experimentos en las curvas 31a, 31b, 31c, 32b, que están mostradas en las figuras 5 y 6. Se ha representado la intensidad de la señal en función de la temperatura. Las curvas 31a, 31b muestran las curvas de fusión para el tipo natural FcV y las curvas 32a, 32b para FcV-Leiden. Puede reconocerse, sin más, que, cuando se utiliza el procedimiento de conformidad con la invención con el aditivo aportado, las curvas de fusión 31b, 32b (figura 6) pueden ser reproducidas de una manera esencialmente mejor (es decir, que para el tipo natural FcV y para el FcV-Leiden se encuentran respectivamente de una manera más próxima entre sí) y que resultan diferencias de señal más claras que sin el empleo del procedimiento de conformidad con la invención 31a, 32a (figura 5). Ante todo, a las temperaturas más elevadas ($T > 35^\circ\text{C}$), los híbridos se funden de una manera esencialmente más limpia. Una propiedad ventajosa de ese procedimiento podría ser que la concentración de NaCl y de EDTA aumenta en la cámara 140 (cámara para la detección) durante la hibridación.

Se recalca que el ejemplo de realización, que ha sido descrito, es únicamente ejemplificativo y que puede imaginarse un gran número de variaciones en lo que se refiere al tipo y a la concentración del aditivo, al tipo de la detección y a la conducción de la reacción.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para el análisis de ácidos nucleicos en un dispositivo microfluídico, cuyo procedimiento presenta las etapas siguientes:
 - a) la amplificación de los ácidos nucleicos en una primera cámara en el dispositivo microfluídico;
 - 5 b) la puesta en contacto de los ácidos nucleicos amplificados con un aditivo, adecuado para llevar a cabo la elaboración de los ácidos nucleicos amplificados, destinados a una hibridación subsiguiente sobre oligonucleótidos sonda, cuyo aditivo presenta:
 - i.) cationes monovalentes y
 - ii.) un agente enlazante de los iones Mg^{2+} ,
 - 10 estando previsto el aditivo, que está acumulado en forma de reactivo seco, en una segunda cámara en el dispositivo microfluídico y;
 - c) la hibridación de los ácidos nucleicos amplificados sobre, al menos, un oligonucleótido sonda, siendo empleada para llevar a cabo la reacción de hibridación una mezcla constituida por el producto de la amplificación en bruto y por el aditivo.
- 15 2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que los cationes monovalentes están previstos en forma de iones Na^{+} .
3. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, en el que el agente enlazante de los iones Mg^{2+} es el EDTA.
4. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que se introduce un disolvente en la segunda cámara como paso previo a la puesta en contacto del aditivo con el ácido nucleico amplificado.
- 20 5. Procedimiento según la reivindicación 4, en el que es transferido el aditivo, en forma disuelta, desde la segunda cámara hasta la primera cámara, con objeto de poner en contacto al aditivo con los ácidos nucleicos amplificados.
6. Procedimiento según una de las reivindicación 1 a 3, en el que los ácidos nucleicos amplificados son transferidos desde la primera cámara hasta la segunda cámara, con objeto de poner en contacto al aditivo con los ácidos nucleicos amplificados.
- 25 7. Procedimiento según la reivindicación 6, en el que los ácidos nucleicos amplificados son transferidos en solución, en forma de producto de la amplificación en bruto, hasta la segunda cámara y, a continuación, son conducidos en forma de mezcla con el aditivo con el oligonucleótido sonda, al menos único.
8. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, en el que la amplificación de los ácidos nucleicos se lleva a cabo por medio de una reacción RCP.
- 30 9. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, en el que el oligonucleótido sonda, al menos único, está inmovilizado en forma de un sistema, en forma de micromatriz, sobre un soporte.
10. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, en el que se lleva a cabo una detección de los ácidos nucleicos hibridados, amplificados sobre los oligonucleótidos sonda.
- 35 11. Procedimiento según la reivindicación 10, en el que la detección se lleva a cabo con aprovechamiento de una etiqueta (un marcador) de los ácidos nucleicos amplificados.
12. Procedimiento según la reivindicación 11, en el que la etiqueta es una etiqueta óptica o es una etiqueta enzimática.
13. Procedimiento según la reivindicación 12, en el que la etiqueta cataliza una reacción enzimática, que puede ser detectada de forma óptica o electroquímica.
- 40 14. Procedimiento según la reivindicación 13, en el que la detección electroquímica está constituida por una medición de la corriente eléctrica intensificada por medio de una fluctuación redox.

15. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, en el que el aditivo presenta un agente aglutinante.

16. Sistema para llevar a cabo la realización del procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 15, que está previsto en un dispositivo microfluídico, que presenta:

- 5 a) una primera cámara, que está proyectada para llevar a cabo la amplificación de los ácidos nucleicos, y
- b) una segunda cámara, en la que está acumulado un aditivo estable al almacenamiento en forma de reactivo seco, que es adecuado para llevar a cabo la elaboración de ácidos nucleicos amplificados destinados a una hibridación subsiguiente sobre oligonucleótidos sonda, cuyo aditivo presenta

- i) cationes monovalentes y

- 10 ii) un agente enlazante de los iones Mg^{2+} ,

pudiendo ser conectada en comunicación fluidica la segunda cámara, a través de una conexión, con la primera cámara, pudiendo ser puestos en contacto los ácidos nucleicos amplificados con el aditivo de tal manera, que se encuentre a disposición una mezcla constituida por el producto de la amplificación en bruto y por el aditivo, para llevar a cabo una reacción de hibridación.

- 15 17. Sistema según la reivindicación 16, en el que los cationes monovalentes están previstos en forma de iones Na^+ .

18. Sistema según una de las reivindicaciones 16 ó 17, en el que el agente enlazante de los iones Mg^{2+} es el EDTA.

19. Sistema según una de las reivindicaciones 16 a 18, en el que están previstos medios para llevar a cabo la transferencia del fluido selectivamente desde la primera cámara hasta la segunda cámara.

- 20 20. Sistema según una de las reivindicaciones 16 a 18, en el que están previstos medios para llevar a cabo la transferencia del fluido selectivamente desde la segunda cámara hasta la primera cámara.

21. Sistema según la reivindicación 20, en el que están previstos medios para introducir un disolvente en la segunda cámara.

22. Sistema según una de las reivindicaciones 16 a 21, que presenta, además, un sistema en forma de micromatriz, que presenta oligonucleótidos sonda, que están inmovilizados sobre un soporte.

- 25 23 Sistema según una de las reivindicaciones 6 a 22, que presenta, además, medios para llevar a cabo la detección óptica o electroquímica de ácidos nucleicos hibridizados.

FIG 1

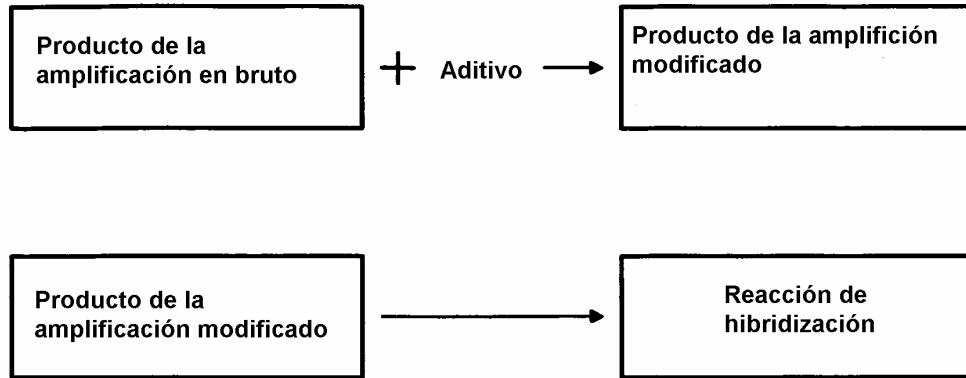


FIG 2

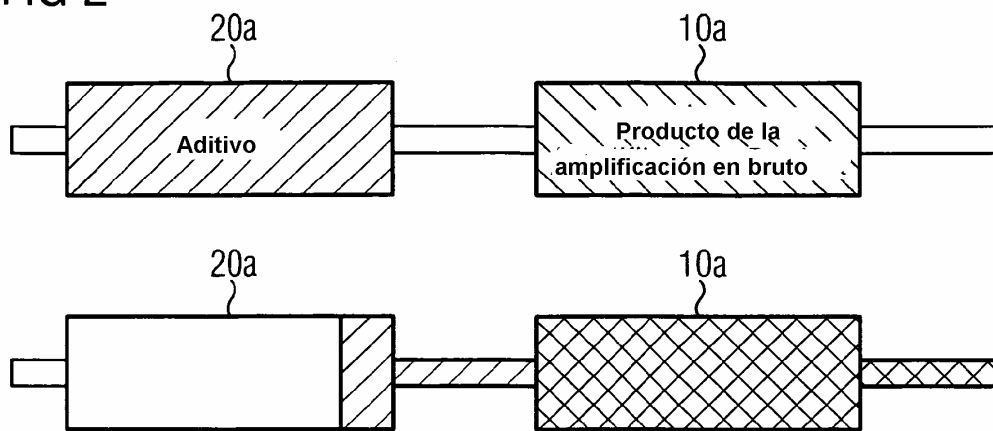


FIG 3

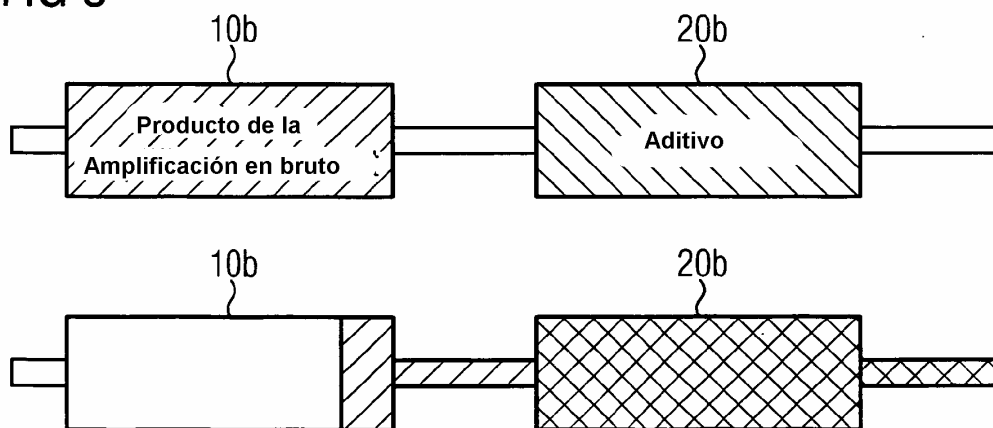


FIG 4

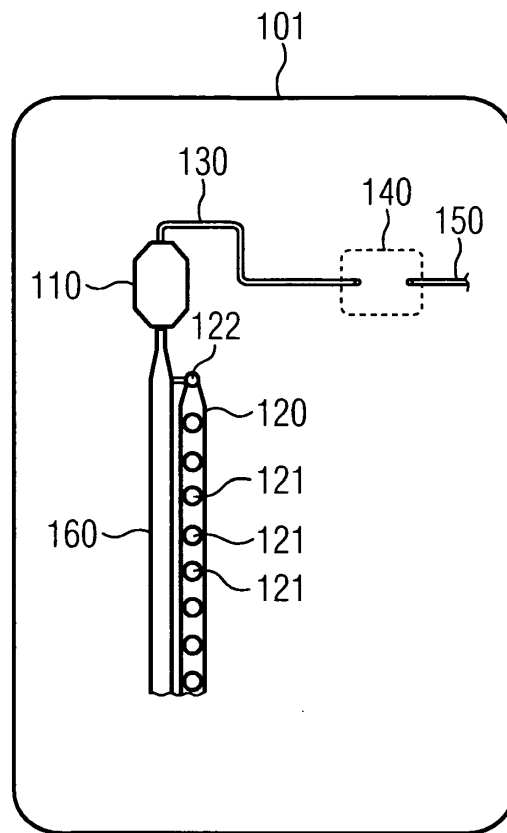


FIG 5

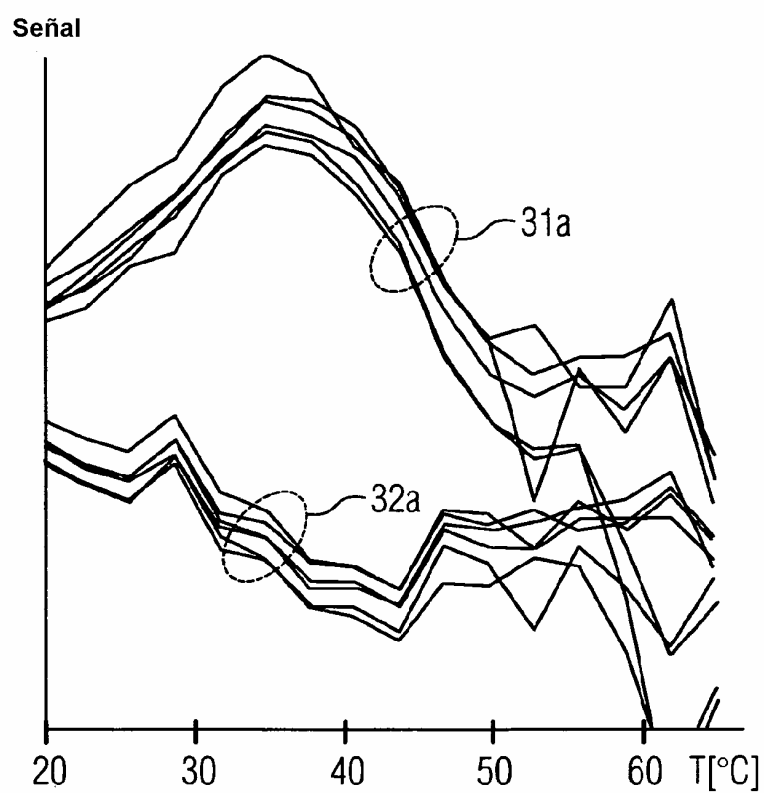


FIG 6

