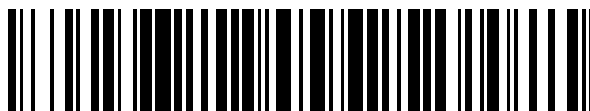


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 380 844**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08829141 .4**
96 Fecha de presentación: **08.09.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2198293**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.06.2010**

54 Título: **Determinación de la variación en el número de copias, métodos y sistemas**

30 Prioridad:
07.09.2007 US 967897 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
18.05.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
18.05.2012

73 Titular/es:
**FLUIDIGM CORPORATION
7000 SHORELINE COURT, SUITE 100
SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080, US**

72 Inventor/es:
RAMAKRISHNAN, Ramesh

74 Agente/Representante:
de Elzaburu Márquez, Alberto

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

ES 2 380 844 T3

DESCRIPCIÓN

Determinación de la variación en el número de copias, métodos y sistemas

Campo de la invención

La invención se refiere a un método para determinar la variación en el número de copias dentro de un genoma de poblaciones pequeñas o de individuos, y encuentra aplicación en biología y medicina.

Antecedentes de la invención

Una "PCR digital" se refiere a un método en el que moléculas de ácidos nucleicos individuales presentes en una muestra se distribuyen en muchos volúmenes de reacción distintos (por ejemplo, cámaras o partes alícuotas) antes de la amplificación mediante PCR de una o más secuencias diana. La concentración de moléculas individuales en la muestra se ajusta para que, después de la distribución, cada volumen de reacción contenga menos de una molécula polinucleotídica discreta (o agregado de moléculas polinucleotídicas enlazadas), y la mayoría de las cámaras contengan una o ninguna molécula. La amplificación de una secuencia diana produce una salida digital binaria en la que cada cámara se identifica como que contiene o que no contiene el producto de la PCR indicativo de la presencia de la correspondiente secuencia diana. Un recuento de los volúmenes de reacción que contienen niveles detectables de productos finales de la PCR es una medición directa de la cantidad absoluta de ácidos nucleicos. En una versión de la PCR digital, las moléculas polinucleotídicas se distribuyen mediante su reparto en volúmenes de reacción separados. Un método de reparto emplea la matriz digital BioMark™ 12.765 (Fluidigm Corp., South San Francisco, CA). Este chip utiliza canales integrados y válvulas que reparten mezclas de muestras y reactivos en cámaras de reacción con un volumen de 765 nanolitros. Las moléculas de ADN en cada mezcla se reparten aleatoriamente en las 765 cámaras de cada panel. El chip entonces se somete a termociclado y se forma una imagen en un sistema de PCR a tiempo real BioMark de Fluidigm, y las cámaras positivas que originariamente contenían una o más moléculas pueden ser contadas por el programa informático de análisis de matrices digitales. Para unos análisis sobre la PCR digital véase, por ejemplo, Vogelstein y Kinzler, 1999, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96:9236-9241; McBride *et al.*, publicación de la solicitud de patente de EEUU nº 20050252773, en especial el ejemplo 5.

Las variaciones en el número de copias ("copy number variations", CNV) son las ganancias o las pérdidas de regiones genómicas que varían en tamaño de 500 bases o más (a menudo entre cinco mil y cinco millones de bases). Estudios del genoma completo han revelado la presencia de un gran número de regiones CNV en seres humanos y una amplia gama de diversidad genética entre la población general. Las CNV han sido el foco de muchos estudios recientes debido a su papel en trastornos genéticos humanos. Véase, por ejemplo, lafrate *et al.*, 2004, Detection of large-scale variation in the human genome, *Nat. Genet.*, 36:949-951; Sebat *et al.*, 2004, Large-scale copy number polymorphism in the human genome, *Science*, 305:525-528; Redon *et al.*, 2006, Global variation in copy number in the human genome, *Nature*, 444:444-454; Wong *et al.*, 2007, A comprehensive analysis of common copy-number variations in the human genome, *Am. J. Hum. Genet.*, 80:91-104; Ropers, 2007, New perspectives for the elucidation of genetic disorders, *Am. J. Hum. Genet.*, 81:199-207; Lupski, 2007, Genomic rearrangements and sporadic disease, *Nat. Genet.*, 39:S43-S47. La aneuploidía, tal como una trisomía o la delección de un cromosoma completo, es un tipo limitante de variación en el número de copias asociado con una diversidad de enfermedades humanas.

Breve resumen de la invención

La invención proporciona un método para determinar el número de copias relativo de una secuencia polinucleotídica diana en el genoma de un sujeto, que comprende:

preamplificar una secuencia polinucleotídica diana y una secuencia polinucleotídica de referencia en una muestra que contiene ADN genómico del sujeto;

ensayar la secuencia polinucleotídica diana y la secuencia polinucleotídica de referencia de la muestra preamplificada mediante una PCR digital;

determinar (a) el número de moléculas polinucleotídicas amplificadas que contienen la secuencia polinucleotídica diana, y (b) el número de moléculas polinucleotídicas amplificadas que contienen la secuencia polinucleotídica de referencia, y determinar la proporción de (a) a (b). La invención se refiere a un método para determinar la variación en el número de copias dentro de un genoma de poblaciones pequeñas o de individuos. El método proporciona la preamplificación del gen de interés en una muestra antes del análisis mediante PCR digital. La etapa de preamplificación permite la distribución de copias individuales del gen en muestras de reacción de PCR individuales para la detección de una manera que es más representativa del número de copias real que cuando se determina mediante PCR digital sin preamplificación.

Los métodos de la invención basados en la PCR digital tienen la capacidad de distinguir diferencias en menos de 2 veces en el número de copias de genes con gran precisión. Por ejemplo, pueden diferenciar entre 1, 2, 3 y 4 copias de genes en diferentes muestras. Para asegurar que la diferencia aparente en el número de copias de genes en

diferentes muestras es real, y no está distorsionada por diferencias en las cantidades de muestra, los inventores emplean una expresión, el número de copias relativo. El número de copias relativo de un gen (por genoma humano) puede expresarse como la proporción del número de copias de un gen diana al número de copias de un gen de referencia de una sola copia en una muestra de ADN, que habitualmente es 1. Por ejemplo, el gen de la ARNasa P es un gen de una sola copia que codifica el resto de ARN de la enzima ARNasa P, y puede utilizarse como gen de referencia en un ensayo de número de copias.

Un chip de matriz digital disponible en el mercado, tal como el que se ilustra en la figura 3, para realizar una PCR digital se ha utilizado para cuantificar el ADN en una muestra. El chip tiene 12 puertos de entrada de muestras para la introducción de una mezcla de muestra. Cada mezcla de muestra se reparte en 765 cámaras de reacción en cada uno de los 12 paneles. Tal como se describe en la bibliografía (véase, por ejemplo, McBride *et al.*, publicación de la solicitud de patente de EEUU nº 20050252773), la capacidad para cuantificar el ADN en muestras se basa en el hecho de que, cuando se introduce una cantidad apropiada de ADN, las moléculas de ADN individuales se distribuyen aleatoriamente en las cámaras.

Utilizando dos ensayos para dos genes (por ejemplo, ARNasa P y otro gen de interés) con dos tintes fluorescentes en un chip es posible cuantificar simultáneamente la ARNasa P y el otro gen en la misma muestra de ADN y obtener una buena estimación de la proporción de estos dos genes y el número de copias del gen de interés.

Sin embargo, cuando están duplicados, múltiples copias de un gen pueden estar estrechamente vinculadas en el mismo cromosoma y, por tanto, no pueden separarse entre sí, incluso en la matriz digital. Como resultado, múltiples copias se comportarían como una sola molécula, y el número total de copias del gen sería muy subestimado.

La presente invención se ocupa de este problema incluyendo una etapa de preamplificación en el proceso. La preamplificación es una reacción de PCR con cebadores para el gen de interés y para un gen de referencia (por ejemplo, el gen ARNasa P). Generalmente se realiza durante un número limitado de ciclos térmicos (por ejemplo, 10 ciclos); suponiendo unas eficacias de PCR iguales, los números de copias de ambos genes aumentan proporcionalmente en la etapa de preamplificación. Utilizando este proceso, aunque múltiples copias de un gen estén vinculadas entre sí sobre el genoma, después de la preamplificación cada copia del gen de interés se amplificará por separado, y se repartirá por separado en diferentes cámaras de la matriz digital. Puesto que la moléculas recién generadas de ambos genes reflejan la proporción original y ya no están vinculadas entre sí, un análisis con un chip digital puede cuantificar las moléculas de los dos genes y medir la proporción de los dos genes (y por tanto el número de copias del gen de interés) de modo preciso.

Por tanto, la presente invención proporciona métodos para realizar análisis basados en genes. De modo más específico, los métodos de la presente invención en general se refieren a la determinación de la variación en el número de copias de un polinucleótido de interés en una muestra procedente de un sujeto.

La invención proporciona, según se especifica en las reivindicaciones, un método para determinar el número de copias relativo de una secuencia polinucleotídica diana en el genoma de un sujeto, que incluye las etapas de:

a) preamplificar una secuencia génica diana y una secuencia génica de referencia en una muestra que contiene ADN genómico del sujeto, produciendo con ello una muestra amplificada;

b) realizar una PCR digital distribuyendo el producto de a) en una pluralidad de volúmenes de reacción aislados, amplificando las secuencias génicas diana y de referencia en cada volumen de reacción, y determinando la cantidad relativa de las secuencias génicas diana y de referencia en la muestra amplificada, en el que la cantidad relativa de las secuencias génicas diana y de referencia en la muestra amplificada se corresponde con la cantidad relativa de las secuencias génicas diana y de referencia en el genoma.

Tal como se especifica en las reivindicaciones, la invención proporciona un método para determinar el número de copias relativo de una secuencia polinucleotídica diana en el genoma de un sujeto, que incluye las etapas de:

preamplificar una secuencia génica diana y una secuencia génica de referencia en una muestra que contiene ADN genómico del sujeto;

ensayar la secuencia génica diana y la secuencia génica de referencia de la muestra preamplificada mediante PCR digital;

determinar (a) el número de moléculas polinucleotídicas amplificadas que contienen la secuencia génica diana, y (b) el número de moléculas polinucleotídicas amplificadas que contienen la secuencia génica de referencia, y determinar la proporción de (a) a (b).

En una realización de la invención que se encuentra dentro del alcance de las reivindicaciones, se proporciona un método para determinar el número de copias de una secuencia polinucleotídica diana en el genoma de un sujeto, que incluye las etapas de:

realizar una primera amplificación de polinucleótidos de una muestra de ADN obtenida a partir de un sujeto, en

la que se amplifica una secuencia polinucleotídica diana y una secuencia polinucleotídica de referencia, teniendo dicha secuencia de referencia un número de copias genómicas predeterminado N, produciendo con ello una muestra amplificada;

distribuir toda o parte de la muestra amplificada en una pluralidad de volúmenes de reacción aislados;

5 realizar, en cada volumen de reacción, una segunda amplificación de polinucleótidos en la que la secuencia polinucleotídica diana o una subsecuencia de esta se amplifica si está presente, y la secuencia polinucleotídica de referencia o una subsecuencia de esta se amplifica si está presente;

10 determinar (a) el número de volúmenes de reacción en los que la secuencia polinucleotídica diana, o una subsecuencia de esta, está presente (A), y determinar (b) el número de volúmenes de reacción en los que la secuencia polinucleotídica de referencia, o una subsecuencia de esta, está presente (B); en el que el número de copias del polinucleótido diana en el genoma es aproximadamente igual a $(A)/(B) \times N$.

15 En algunas realizaciones, según se especifica en las reivindicaciones, la muestra procede de un ser humano. En realizaciones concretas, la proporción de (a) a (b) es de aproximadamente 0,5 y existe una delección de (a) sobre un cromosoma, o la proporción de (a) a (b) es de aproximadamente 1,5 y existe una duplicación de (a) sobre un cromosoma. En algunas realizaciones, una proporción de la secuencia génica diana a la secuencia génica de referencia que se desvíe sustancialmente de un valor de 1 indica un número de copias anómalo de la secuencia del gen diana en el genoma del paciente.

20 En algunas realizaciones de la invención que se incluyen dentro del alcance de las reivindicaciones, la realización de la primera amplificación de polinucleótidos incluye combinar la muestra biológica con una composición que comprende cebadores específicos para la secuencia polinucleotídica diana, y cebadores específicos para la secuencia polinucleotídica de referencia, y realizar un ensayo de reacción en cadena de polimerasa (PCR) para amplificar por separado el polinucleótido diana y el polinucleótido de referencia en una proporción sustancialmente idéntica.

25 En algunas realizaciones de la invención que se incluyen dentro del alcance de las reivindicaciones, pero que no se reivindican específicamente, la primera amplificación de polinucleótidos tiene de 4 a 15 ciclos térmicos. En algunas realizaciones de la invención que se incluyen dentro del alcance de las reivindicaciones, los volúmenes de reacción se disponen en un dispositivo de microfluidos, y la primera amplificación de polinucleótidos se realiza en un volumen de reacción separado del dispositivo de microfluidos.

30 En algunas realizaciones de la invención que se incluyen dentro del alcance de las reivindicaciones, antes de la etapa de distribución, toda o parte de la muestra amplificada se combina con reactivos seleccionados para la amplificación de la secuencia génica diana y de la secuencia génica de referencia. Normalmente se emplea una porción, y la muestra amplificada puede diluirse antes de la distribución de una porción a los volúmenes de reacción. En algunas realizaciones, la amplificación es una amplificación mediante PCR.

35 En algunas realizaciones de la invención que se incluyen dentro del alcance de las reivindicaciones, los cebadores de la amplificación de la secuencia génica de referencia utilizados en la primera etapa de amplificación de polinucleótidos son los mismos que los utilizados en la segunda etapa de amplificación de polinucleótidos. En algunas realizaciones de la invención que se incluyen dentro del alcance de las reivindicaciones, los cebadores de la amplificación de la secuencia génica diana utilizados en la primera etapa de amplificación de polinucleótidos son los mismos que los utilizados en la segunda etapa de amplificación de polinucleótidos. En algunas realizaciones, los reactivos comprende una primera sonda que se hibrida selectivamente con una secuencia génica diana, y una segunda sonda que se hibrida selectivamente con una secuencia génica de referencia bajo condiciones adecuadas para la amplificación de polinucleótidos. En algunas realizaciones, la primera y la segunda sonda comprenden marcadores detectables diferentes, y la unión de la primera o la segunda sonda, o la degradación de la primera o la segunda sonda tras una polimerización basada en una reacción en cadena de polimerasa (PCR), produce un cambio en la fluorescencia detectable del respectivo marcador detectable.

45 En algunas realizaciones, la secuencia génica de referencia comprende una secuencia polinucleotídica que codifica al menos parcialmente una enzima ARNasa P, beta-actina o GAPDH. En algunas realizaciones, que no se reivindican de modo específico, la determinación del número de copias relativo de la secuencia génica diana comprende detectar una pérdida de heterocigosidad en el genoma del sujeto. En algunas realizaciones de la invención que se incluyen dentro del alcance de las reivindicaciones, pero que no se reivindican de modo específico, una proporción de secuencia génica diana a secuencia génica de referencia con un valor sustancialmente mayor o menor que 1 indica una pérdida de heterocigosidad en el genoma del paciente.

50 Para comprender más a fondo la naturaleza y las ventajas de la presente invención, debe hacerse referencia a la posterior descripción detallada, tomada en conjunto con los dibujos adjuntos. Los dibujos representan realizaciones de la presente invención como ilustración. La invención puede modificarse en diversos aspectos sin apartarse de la invención. Por consiguiente, los dibujos/figuras y la descripción de estas realizaciones son de naturaleza ilustrativa, no restrictiva.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es un diagrama de flujo que ilustra las etapas generales de un método de la invención según se describe en la presente.

Las figuras 2A-2B ilustran ejemplos de diseños de canales de un dispositivo de microfluidos.

5 La figura 3 es un diagrama simplificado de un dispositivo de microfluidos.

Las figuras 4A-4C muestran porciones del dispositivo de microfluidos ilustrado, por ejemplo, en la figura 1.

La figura 5 ilustra ejemplos de resultados de variaciones en el número de copias obtenidos utilizando un dispositivo de microfluidos.

10 La figura 6 ilustra ejemplos de resultados de pérdida de heterocigosidad obtenidos utilizando un dispositivo de microfluidos.

La figura 7 es una gráfica que muestra la detección de la pérdida de heterocigosidad, según una realización de la presente invención que se incluye dentro del alcance de las reivindicaciones, pero que no se reivindica de modo específico.

15 La figura 8 es un esquema que muestra los resultados parciales de un experimento imaginario en el que se determina el número de copias de la secuencia diana T. Se ilustra una matriz de volúmenes de reacción 64 x 64, en la que una secuencia diana se amplifica y se detecta utilizando sondas marcadas con VIC (amarillo), y se amplifica y se detecta una secuencia de referencia de una sola copia utilizando sondas marcadas con FAM (verde). Se detectaron 19 volúmenes de reacción con marcadores amarillos y 12 volúmenes de reacción con marcadores verdes, indicando una proporción de aproximadamente 1,5 ($19/12 = 1,58 \approx 1,5$), que indica que existen tres copias de la secuencia diana por genoma diploide.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona un método para determinar el número de copias relativo de una secuencia polinucleotídica diana en el genoma de un sujeto, que comprende:

25 preamplificar una secuencia polinucleotídica diana y una secuencia polinucleotídica de referencia en una muestra que contiene ADN genómico del sujeto;

ensayar la secuencia polinucleotídica diana y la secuencia polinucleotídica de referencia de la muestra preamplificada mediante una PCR digital;

30 determinar (a) el número de moléculas polinucleotídicas amplificadas que contienen la secuencia polinucleotídica diana, y (b) el número de moléculas polinucleotídicas amplificadas que contienen la secuencia polinucleotídica de referencia, y determinar la proporción de (a) a (b).

La presente invención proporciona métodos para determinar el número de copias de una secuencia polinucleotídica diana en el genoma de un sujeto, incluyendo las variaciones en el número de copias asociadas con enfermedades genéticas. En particular, los métodos y los sistemas descritos en la presente pueden utilizarse para detectar las variaciones en el número de copias de un polinucleótido diana en el genoma de un paciente empleando material genómico presente dentro de una muestra derivada del paciente. Las técnicas de la presente invención emplean generalmente ensayos basados en la amplificación de polinucleótidos para determinar el número de copias relativo de una secuencia polinucleotídica diana y una secuencia polinucleotídica de referencia en una muestra. Se conoce el número de copias genómicas para la secuencia de referencia. Como tal, el número de copias del polinucleótido diana puede analizarse con relación al polinucleótido de referencia para determinar el número de copias relativo del polinucleótido diana. Las secuencias polinucleotídicas diana y/o de referencia a veces se denomina "genes". Sin embargo, se apreciará que el término "gen" no indica una secuencia que necesariamente codifique una proteína (o un ARN).

45 Las técnicas de detección y análisis del número de copias pueden utilizar ciertos dispositivos de alta capacidad de procesamiento adecuados para el denominado "análisis digital" o "PCR digital", tales como dispositivos de microfluidos que incluyen un gran número o una alta densidad de sitios de reacción de pequeño volumen (por ejemplo, volúmenes de reacción o sitios de reacción con nanovolumen). Por consiguiente, las técnicas de detección y análisis de la variación en el número de copias según la presente invención, según se especifica en las reivindicaciones, pueden incluir distribuir o repartir una muestra entre cientos a miles de volúmenes de reacción dispuestos en una plataforma de reacción/ensayo o un dispositivo de microfluidos, incluyendo los ejemplos de dispositivos descritos en la presente.

50 Los métodos de la presente invención incluyen, según se especifica en las reivindicaciones, una etapa de preamplificación en la que un ADN (por ejemplo, ADN genómico) procedente de una muestra biológica se amplifica utilizando la reacción de cadena de polimerasa (PCR) u otras técnicas de amplificación cuantitativas. Los ejemplos

de muestras biológicas incluyen células (que incluyen células lisadas y homogeneizados celulares), suero, y fluidos biológicos. Aunque los métodos de la presente en general se describen con respecto al ADN humano (por ejemplo, para determinar la variación en el número de copias en el genoma de un paciente humano), se reconocerá que los métodos pueden modificarse/adaptarse a cualquier muestra que tenga variaciones en las cantidades de material genético. Por ejemplo, los métodos pueden utilizarse para el análisis genético de animales, plantas, bacterias y hongos, así como para el análisis genético de sujetos humanos. Los métodos para recoger y procesar muestras biológicas que contienen ADN son muy conocidos y no es necesario que se analicen en la presente. Para los ensayos de la invención, el ADN puede aislarse a partir de células o fluidos biológicos, o el ensayo puede realizarse utilizando, por ejemplo, un lisado celular que contenga ADN. Por tanto, tal como se emplea en la presente, una "muestra de ADN" puede referirse a ADN, en especial ADN genómico, en forma purificada, semipurificada, o no purificada. Tal como se emplea en la presente, una etapa para "obtener una muestra de ADN de un sujeto" se refiere simplemente al hecho de que la muestra de ADN es el material de partida para posteriores etapas analíticas (por ejemplo, la etapa de preamplificación). "Obtener una muestra de ADN" no implica el acto, por ejemplo, de recoger células de un sujeto, o de aislar ADN, sino que simplemente puede ser una cuestión de obtener un tubo que contenga ADN recogido previamente.

La figura 1 ilustra las etapas generales para realizar los métodos descritos en la presente. En una realización ilustrativa, las etapas del método implican proporcionar una mezcla maestra de preamplificación que comprende cebadores de ensayo, un sistema tamponante adecuado, nucleótidos, y una enzima ADN polimerasa (tal como una enzima polimerasa modificada para condiciones de "inicio en caliente"), añadir ADN genómico a la mezcla maestra de preamplificación, preamplificar la secuencia o secuencias de interés y la secuencia de referencia, y ensayar las secuencias preamplificadas mediante un análisis de PCR digital (en un ensayo de consumación o en un ensayo a tiempo real), y comparar la frecuencia de la secuencia o secuencias diana con relación a la frecuencia de la secuencia de referencia. Se reconocerá que la figura 1 se proporciona para ayudar a comprender la invención, pero no pretende limitar la invención.

En la etapa inicial de la figura 1, la preamplificación, se realiza una primera amplificación de polinucleótidos de una muestra de ADN obtenida a partir de un sujeto. En la etapa de preamplificación, se amplifica una secuencia polinucleotídica diana y una secuencia polinucleotídica de referencia. Los métodos para la amplificación por PCR son muy conocidos y no es necesario describirlos en la presente.

En algunas realizaciones de la invención que se incluyen dentro del alcance de las reivindicaciones, la secuencia diana es una secuencia cuya delección o duplicación está asociada con un fenotipo de interés. En algunas realizaciones de la invención que se incluyen dentro del alcance de las reivindicaciones, la secuencia diana es una secuencia cuya delección o duplicación no está asociada con un fenotipo de interés conocido, pero se desea conocer información acerca de la distribución o correlación de la variación en poblaciones concretas.

La secuencia de referencia es una secuencia que tiene un número de copias genómicas conocido (o supuesto). Por tanto, no es probable que una secuencia de referencia esté amplificada o delecionada en un genoma. No es necesario determinar empíricamente el número de copias de la secuencia de referencia en cada ensayo. Por el contrario, el número de copias puede suponerse basándose en el número normal de copias en el organismo de interés. Por ejemplo, una secuencia de referencia útil en el genoma humano es la secuencia del gen de ARNasa P, un gen de una sola copia presente en dos copias por genoma diploide (y que tiene un número de copias de 1 por genoma haploide). Como ejemplo, otras secuencias de referencia útiles incluyen β -actina y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH); sin embargo, se apreciará que la invención no se limita a una secuencia de referencia concreta.

La preamplificación puede realizarse como una reacción de PCR con cebadores para la ARNasa P (el gen de referencia) y para el gen diana de interés. Generalmente, las reacciones se realizan durante un número limitado de ciclos térmicos (por ejemplo, 5 ciclos o 10 ciclos). En algunas realizaciones de la invención que se incluyen dentro del alcance de las reivindicaciones, el número óptimo de ciclos dependerá de las eficacias de PCR para el gen de referencia y el gen diana. En ciertas realizaciones, el número de ciclos térmicos durante un ensayo de preamplificación puede variar de aproximadamente 4 a 15 ciclos térmicos, o aproximadamente 4-10 ciclos térmicos. En ciertas realizaciones, el número de ciclos térmicos puede ser 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o más de 15.

Las reacciones de preamplificación preferiblemente son cuantitativas o proporcionales. Es decir, el número relativo (proporción) de amplicones de las secuencias diana y de referencia debe reflejar el número relativo (proporción) de la secuencia diana y de referencia en el ADN genómico (u otro) que se está amplificando. Los métodos para la amplificación cuantitativa son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Arya *et al.*, 2005, Basic principles of real-time quantitative PCR, *Expert Rev. Mol. Diagn.*, 5(2):209-219. En el caso de genes duplicados, deben seleccionarse cebadores de modo que cada copia duplicada del gen diana de interés se amplifique por separado. Así, tras la preamplificación selectiva y la distribución de la muestra en volúmenes de reacción separados, se distribuirá un número proporcional de amplicones que corresponden a cada secuencia en los volúmenes de reacción. Debido a que las moléculas recién generadas de ambos genes reflejan la proporción original, un posterior análisis del número de copias puede cuantificar el número de moléculas del gen diana y del gen de referencia. Como resultado, la proporción de los dos genes puede medirse con precisión. Debido a que se conoce el número de copias de la

secuencia de referencia, puede determinarse el número de copias de la secuencia de interés.

Resulta deseable que las eficacias de la amplificación de las secuencias diana y de referencia sean similares o aproximadamente iguales, para no introducir ningún sesgo en la proporción de los números de copias de los dos genes. Por esta razón, deben seleccionarse parejas de cebadores y condiciones de la amplificación para obtener este resultado. La eficacia de la amplificación de cualquier pareja de cebadores puede determinarse con facilidad utilizando técnicas habituales (por ejemplo, véase Furtado *et al.*, "Application of real-time quantitative PCR in the analysis of gene expression", DNA amplification: Current Technologies and Applications, Wymondham, Norfolk, Reino Unido, Horizon Bioscience, pp. 131-145, (2004)).

Aunque resulta deseable que las eficacias de la amplificación de las secuencias diana y de referencia sean aproximadamente iguales, el número limitado de ciclos térmicos de preamplificación (generalmente menor que 15, habitualmente 10 o menor que 10, lo más frecuente aproximadamente 5) mitiga en gran medida cualquier diferencia en la eficacia, de modo que es probable que las diferencias habituales tengan un efecto insignificante sobre los resultados.

Tal como se mencionó, los métodos de amplificación son conocidos en la técnica. Como ilustración, la mezcla de reacción utilizada para el método de preamplificación (mezcla o composición de preamplificación) generalmente contiene un tampón apropiado, una fuente de iones magnesio (Mg^{2+}) en el intervalo de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 mM, preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 2 a aproximadamente 8 mM, nucleótidos y, opcionalmente, detergentes, y estabilizantes. Un ejemplo de un tampón adecuado es el tampón TRIS a una concentración de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 85 mM, siendo preferida una concentración de 10 mM a 30 mM. En una realización, la concentración del tampón TRIS es 20 mM en la forma de mezcla de reacción de doble potencia (2x). La mezcla de reacción puede tener un intervalo de pH de aproximadamente 7,5 a aproximadamente 9,0, siendo típico un intervalo de pH de aproximadamente 8,0 a aproximadamente 8,5. La concentración de nucleótidos puede estar en el intervalo de aproximadamente 25 mM a aproximadamente 1000 mM, generalmente en el intervalo de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 800 mM. Los ejemplos de concentraciones de dNTP son 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 y 800 mM. También pueden incluirse en la mezcla detergentes, tales como Tween™ 20, Triton® X 100, y Nonidet™ P40. También pueden incluirse agentes estabilizantes, tales como ditiotreitól (DTT, reactivo de Cleland) o mercaptoetanol. La mezcla de reacción de preamplificación contendrá cebadores para la reacción de preamplificación. Los cebadores en general tendrán la misma secuencia que los utilizados en los posteriores ensayos de PCR que se prepararán para la muestra, aunque en general en concentraciones reducidas. La concentración de cebadores puede ser mayor, igual o menor que las concentraciones de cebadores utilizadas en el ensayo de PCR. Las realizaciones incluyen el uso de cebadores que tienen una concentración aproximadamente 50, 25, 20, 10 o 5 veces mayor, igual, o 10, 2, 35, 50, 65, 75, 100, 125, 150, 175 y 200 veces menor que la concentración de cebadores en el ensayo de PCR. Los cebadores utilizados en la preamplificación pueden incluir polímeros aleatorios, colas de poli-A, y cebadores específicos diseñados para el ensayo PCR de interés.

La mezcla de reacción puede contener opcionalmente un tinte de referencia para normalizar los posteriores resultados del análisis de la PCR cuantitativa real. Un ejemplo de un tinte de referencia habitual disponible en el mercado es ROX. Una mezcla de reacción disponible en el mercado que contiene el tinte ROX es la mezcla de reacción CellsDirect 2X, n° de catálogo 11754-100 y 11754-500, disponible en Invitrogen Corporation.

También se añade una enzima ADN polimerasa (por ejemplo, una Taq polimerasa) a la mezcla de reacción. En una realización, una Taq polimerasa, tal como Taq ADN Platinum®, es una Taq ADN polimerasa recombinante complejada con un anticuerpo que inhibe la actividad polimerasa a temperatura ambiente. La actividad polimerasa completa se restablece después de la etapa de desnaturalización en PCR, proporcionando un "inicio en caliente".

Las muestras preamplificadas preparadas mediante los métodos de la presente invención son particularmente adecuadas para análisis de PCR digitales y para distinguir la duplicación cromosómica de genes. En particular, una muestra preamplificada se ensaya en una pluralidad de experimentos de PCR de bajo volumen. En la PCR digital, se ejecutan ensayos idénticos (o sustancialmente similares) sobre una muestra del ADN genómico. El número de reacciones individuales para una muestra genómica concreta puede variar de aproximadamente 2 a más de 1.000.000. Preferiblemente, el número de ensayos realizados sobre una muestra es 100 o mayor, más preferiblemente 200 o mayor, más preferiblemente 300 o mayor. También puede realizarse una PCR digital a escala mayor, en la que el número de ensayos realizados sobre una muestra es 500 o mayor, 700 o mayor, 765 o mayor, 1.000 o mayor, 2.500 o mayor, 5.000 o mayor, 7.500 o mayor, o 10.000 o mayor. El número de ensayos realizados también puede ser significativamente grande, tal como hasta aproximadamente 25.000, hasta aproximadamente 50.000, hasta aproximadamente 75.000, hasta aproximadamente 100.000, o mayor que 1.000.000 ensayos por muestra genómica. La cantidad de ADN utilizada en un ensayo de PCR digital en general se selecciona de forma que un fragmento de ácido nucleico o menos está presente en cada reacción de PCR digital individual.

Tal como se ilustra en la figura 1, tras la etapa de preamplificación, la muestra (o una porción de esta) que comprende el producto de la preamplificación que tiene material genético proporcionalmente amplificado (por ejemplo, amplicones que corresponden a las secuencias polinucleotídicas diana y de referencia) se distribuye en volúmenes de reacción o emplazamientos discretos de modo que cada pocillo de reacción incluye, por ejemplo, una

media de no más de aproximadamente un amplicón por volumen. Así, la mayoría de los volúmenes de reacción no tendrán amplicones, o tendrán un amplicón de la secuencia diana, o un amplicón de la secuencia de referencia. En general, resulta útil diluir la muestra preamplificada (generalmente 1:10-1:20) y/o emplear una porción pequeña de la muestra amplificada para ajustar la concentración de amplicones de modo que (de media) sean cero o un amplicón por volumen de reacción. Aunque en algunos casos el producto de la etapa de preamplificación puede utilizarse sin la adición de otros reactivos de amplificación (por ejemplo, polimerasa), en general es útil añadir nuevos reactivos para la amplificación que incluyen, opcionalmente, diferentes cebadores. Así, la muestra biológica, antes o después de la distribución, puede combinarse con reactivos seleccionados para una amplificación cuantitativa o no cuantitativa de una secuencia polinucleotídica diana y de una secuencia polinucleotídica de referencia 12 (etapa 2).

Además, aunque la etapa de preamplificación es, en general, una amplificación de tipo PCR, la segunda amplificación (es decir, la amplificación de las secuencias de amplicones producidas en la preamplificación) puede realizarse utilizando cualquier método de amplificación tal como, por ejemplo y sin limitación, *Nasba* (Compton, 1991, Nucleic Acid Sequence-based Amplification, *Nature*, 350:91-91, 1991) y el protocolo Eberwine (Van Gelder *et al.*, Amplified RNA synthesized from limited quantities of heterogeneous cDNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990).

Tal como se indicó anteriormente, se apreciará que la cantidad de moldes de ADN y de amplicones (una función de la cantidad de ADN genómico de partida, del número de ciclos de amplificación, de la eficacia de la amplificación, y del tamaño de los volúmenes de reacción) se ajustará para lograr la distribución deseada. Los expertos en la técnica pueden determinar la concentración de amplicones en los productos de la preamplificación y calcular una cantidad apropiada para su introducción. De manera más conveniente, puede ensayarse un conjunto de diluciones en serie del producto de la preamplificación. Por ejemplo, el dispositivo que aparece en la figura 3 (disponible en el mercado en Fluidigm Corp. como la matriz digital BioMark 12.765) permite ensayar 12 diluciones de modo simultáneo. Opcionalmente, la dilución óptima puede determinarse generando una gráfica de regresión lineal. Para la dilución óptima, la línea debe ser recta y pasar a través del origen. Después puede calcularse la concentración de las muestras originales a partir de la gráfica.

Tras la distribución, el material genómico contenido en una pluralidad de cámaras de reacción puede amplificarse para realizar después ensayos de muestras para determinar el número de los volúmenes de reacción en que los amplicones correspondientes a la secuencia diana o de referencia están secuestrados (figura 1, 14). La segunda amplificación puede realizarse utilizando los mismos cebadores que los empleados en la preamplificación, o bien cebadores diferentes (por ejemplo, un conjunto anidado).

La detección y el análisis diferencial de la muestra puede realizarse de modo que se distinga una señal que surja del polinucleótido diana comparado con el polinucleótido de referencia (figura 1, 16). Por ejemplo, puede utilizarse un análisis de diferentes sitios de reacción para calcular la proporción del número de volúmenes de reacción que contienen secuencias polinucleotídicas diana, y el número de volúmenes de reacción que contienen secuencias polinucleotídicas de referencia. Los métodos también pueden incluir detectar y analizar información genéticamente relacionada sobre las secuencias diana en el genoma de un sujeto, incluyendo la detección de deleciones o duplicaciones genéticas, la pérdida de heterocigosidad y similares, tal como una aneuploidia (por ejemplo, trisomía) y numerosas otras anomalías genéticas. A continuación se proporcionan más detalles sobre las etapas del método, incluyendo diversas técnicas de detección y análisis diferencial.

Tal como se analizó anteriormente, la muestra que contiene el producto de la preamplificación o material genético no amplificado puede distribuirse en volúmenes de reacción o emplazamientos discretos de una plataforma de detección y análisis. La distribución de la muestra puede realizarse utilizando una diversidad de técnicas y dispositivos tales como, por ejemplo, una distribución basada en el flujo en dispositivos de microfluidos que incluyen una pluralidad de sitios de reacción/cámaras de volumen pequeño. En general, la etapa de distribución de los métodos descritos en la presente se aplica para aislar muestras del material de interés, por ejemplo, secuencias diana y de referencia, en sitios de reacción individuales para su posterior detección y análisis.

Dentro de cada uno de una pluralidad de volúmenes o sitios de reacción pueden realizarse uno o más ensayos de amplificación, incluyendo reacciones en forma múltiplex de detección y análisis cuantitativo/amplificación de la secuencia polinucleotídica diana y de una secuencia polinucleotídica de referencia seleccionada. La proporción de secuencias detectadas en una muestra puede calcularse utilizando técnicas de detección, tales como un análisis de PCR digital, el control mediante curvas de una PCR a tiempo real y/o la comparación de imágenes de consumación de cámaras de reacción positivas para un ensayo frente a otro ensayo. Como alternativa, puede calcularse la concentración de cualquier secuencia en una muestra de ADN (copias/ μ l) utilizando el número de cámaras de reacción positivas en el dispositivo que contengan al menos una copia de esta secuencia, y puede determinarse una proporción de concentraciones de las secuencias diana y de referencia para calcular el número de copias. Véase la solicitud de patente de EEUU nº 12/170414, en tramitación junto con la presente, "Method and Apparatus for Determining Copy Number Variation Using Digital PCR". Véase también Dube *et al.*, 2008, "Mathematical Analysis of Copy Number Variation in a DNA Sample Using Digital PCR on a Nanofluidic Device", PLoS ONE, 3(8):e2876.doi:10.1371/journal.pone.0002876.

Tal como se especifica en las reivindicaciones, la presente invención incluye métodos y técnicas basadas en la

amplificación para determinar la variación en el número de copias de un polinucleótido diana, por ejemplo, en el genoma de un paciente. En algunos casos, la etapa de preamplificación puede realizarse antes de la distribución de la muestra en un dispositivo de microfluidos para la posterior amplificación y análisis cuantitativo. La preamplificación puede resultar deseable, por ejemplo, cuando múltiples copias de un gen diana están muy juntas sobre el mismo cromosoma y, por tanto, las secuencias dianas no pueden separarse entre sí de modo óptimo durante un análisis cuantitativo, por ejemplo, cuando se distribuyen en un dispositivo de microfluidos. En estos casos, pueden contarse o cuantificarse un número menor de las múltiples copias del gen diana, y dar un resultado de una molécula en lugar de dos. Por consiguiente, el número total de copias del gen puede subestimarse.

Según la presente invención, los cálculos de la CNV incluirán el cálculo del “número de copias relativo” para distinguir, de modo ventajoso, las diferencias aparentes en el número de copias de genes en diferentes muestras de la distorsión o ruido/error del ensayo, siendo provocada dicha distorsión por diferencias en las cantidades de las muestras. El número de copias relativo de un gen (por genoma) puede expresarse como la proporción del número de copias de un gen diana al número de copias de un gen de referencia de una sola copia en una muestra de ADN de concentración (número de copias) conocida en el genoma del paciente, que generalmente es igual a 1. Utilizando dos ensayos para los dos genes (el polinucleótido diana y el polinucleótido de referencia) con dos marcadores diferentes (por ejemplo, tintes fluorescentes) en la misma matriz digital, los métodos descritos en la presente pueden utilizarse para cuantificar de modo simultáneo ambos genes en la misma muestra de ADN. Como alternativa, y de modo menos conveniente, los amplicones diana (procedentes de la preamplificación) pueden amplificarse en un chip de un conjunto de volúmenes de reacción, y los amplicones de ensayo (procedentes de la preamplificación) pueden ensayarse en un conjunto diferente de amplicones, y los datos se comparan. La proporción de estos dos genes es el número de copias relativo de la secuencia polinucleotídica diana, o gen de interés, en una muestra de ADN. En una estrategia, este método puede resumirse como la determinación del número de volúmenes de reacción en que la secuencia polinucleotídica diana, o una subsecuencia de esta, está presente (A), y la determinación del número de volúmenes de reacción en que la secuencia polinucleotídica de referencia, o una subsecuencia de esta, está presente (B), y la determinación de que el número de copias del polinucleótido diana en el genoma es aproximadamente igual a $(A)/(B) \times N$, siendo N el número de copias genómicas predeterminado de la secuencia de referencia. Se entenderá que $(A)/(B) \times N$ está relacionado aproximadamente con el número de copias, porque la plidía en la mayoría de los organismos es baja (por ejemplo, los seres humanos normalmente tienen dos copias de los cromosomas somáticos), mientras que el número de amplicones detectados en la presente invención está inherentemente sometido al error experimental. Por ejemplo, puede determinarse experimentalmente que (A) es 936, y puede determinarse experimentalmente que (B) es 596, y N puede ser 1 por genoma haploide. $(A)/(B) \times N$ es igual a 1,57 (aproximadamente 1,5) que se entiende que puede indicar que existen aproximadamente 1,5 copias de A por genoma haploide (es decir, trisomía de A). Véase la figura 8 y el ejemplo a continuación.

Puede utilizarse una diversidad de plataformas de detección o, en algunos casos, métodos y dispositivos de microfluidos en la práctica de la invención. En algunas realizaciones, pueden construirse dispositivos utilizando una amplia diversidad de materiales, tales como vidrio, plástico, silicona, polímeros elastoméricos (por ejemplo, polidimetilsiloxano, poliuretano u otros polímeros). En algunos casos, los dispositivos de microfluidos utilizados para realizar aspectos de la presente invención pueden construirse generalmente al menos en parte con materiales elastoméricos, y construirse mediante técnicas de litografía blanda de múltiples capas (MSL) y de una sola capa y/o métodos de encapsulación de capa sacrificial (véase, por ejemplo, Unger *et al.*, 2000, *Science*, 288:113-116, y la publicación PCT WO 01/01025). Utilizando estos métodos, en algunos casos pueden diseñarse dispositivos de microfluidos en los que el flujo de la disolución a través de los canales de flujo del dispositivo se controla, al menos en parte, con uno o más canales de control que están separados del canal de flujo mediante un segmento o membrana elastomérica. Este segmento o membrana puede desviarse hacia el interior o retraerse del canal de flujo con el que está asociado un canal de control, aplicando una fuerza de activación a los canales de control. Mediante el control del grado en que la membrana se desvía o se retrae del canal de flujo, el flujo de la disolución puede frenarse o bloquearse por completo a través del canal de flujo. Utilizando combinaciones de canales de control y de flujo de este tipo puede prepararse una diversidad de diferentes tipos de válvulas y bombas para regular el flujo de la disolución según se describe en detalle en Unger *et al.*, *supra*, publicación PCT WO 02/43615 y WO 01/01025.

La distribución de la muestra en los dispositivos de microfluidos descritos en la presente puede aplicarse en parte debido a ciertas propiedades de los materiales elastoméricos, que son reconocidas en general en la técnica. Por ejemplo, Allcock *et al.* (Contemporary Polymer Chemistry, 2ª ed.) describen “elastómeros” o “materiales elastoméricos” en general como polímeros que existen a una temperatura entre su temperatura de transición vítrea y la temperatura de licuefacción. Los materiales elastoméricos muestran propiedades elásticas porque las cadenas poliméricas sufren con facilidad un movimiento torsional para permitir el desenrollamiento del esqueleto de las cadenas en respuesta a una fuerza, volviéndose a enrollar el esqueleto de las cadenas para adoptar la forma anterior en ausencia de la fuerza. En general, los elastómeros se deforman cuando se aplica una fuerza, pero vuelven a su forma original cuando la fuerza se retira. La elasticidad mostrada por los materiales elastoméricos puede caracterizarse mediante el módulo de Young. Los materiales elastoméricos utilizados en los dispositivos de microfluidos descritos en la presente generalmente tienen un módulo de Young de entre aproximadamente 1 Pa-1 TPa, en otros casos entre aproximadamente 10 Pa-100 GPa, en otros casos entre aproximadamente 20 Pa-1 GPa, en otros casos entre aproximadamente 50 Pa-10 MPa, y en ciertos casos entre aproximadamente 100 Pa-1 MPa. También pueden utilizarse materiales elastoméricos que tengan un módulo de Young fuera de estos intervalos

dependiendo de las necesidades de una aplicación concreta.

Dada la tremenda diversidad de químicas de polímeros, precursores, métodos sintéticos, condiciones de reacción, y aditivos potenciales, puede seleccionarse una amplia gama de propiedades para ciertos usos y aplicaciones. Por tanto, con respecto a la presente invención, existe un gran número de posibles sistemas de elastómeros que pueden utilizarse para fabricar bombas y microválvulas elastoméricas monolíticas. Algunos de los dispositivos de microfluidos descritos en la presente se fabrican con un polímero elastomérico tal como GE RTV 615 (formulación), un elastómero de silicona (familia) de tipo vinil-silano reticulado. Sin embargo, los presentes sistemas de microfluidos no se limitan a esta formulación, tipo o incluso a esta familia de polímeros; por el contrario, casi cualquier polímero elastomérico resulta adecuado. La elección de materiales depende generalmente de las propiedades del material concreto (por ejemplo, resistencia a disolventes, rigidez, permeabilidad a gases y/o estabilidad frente a la temperatura) requeridas para realizar la aplicación. Otros detalles con respecto al tipo de materiales elastoméricos que pueden utilizarse para la fabricación de los componentes de los dispositivos de microfluidos descritos en la presente se indican en Unger *et al.*, 2000, Science, 288:113-116, y las publicaciones PCT WO 02/43615 y WO 01/01025.

Fabricación de dispositivos y termociclado

Tal como se ha indicado, las técnicas de la presente invención pueden incorporar el uso de una amplia diversidad de plataformas de detección, incluyendo dispositivos de microfluidos de alta capacidad de procesamiento adecuados para el análisis digital o PCR digital. Los aspectos de la fabricación de dispositivos, componentes del sistema, y aspectos del termociclado se describen con más detalle a continuación.

En algunos casos, pueden construirse dispositivos de microfluidos adecuados para su uso en la presente invención utilizando técnicas de litografía blanda de múltiples capas (MSL) y de una sola capa y/o métodos de encapsulación de capa sacrificial. Una estrategia de MSL básica implica moldear una serie de capas elastoméricas sobre un molde micromecanizado, retirar las capas del molde y después fusionar las capas entre sí. En la estrategia de encapsulación de capa sacrificial, se depositan patrones de compuestos fotorresistentes donde se desea una canal. Estas técnicas y su uso para la producción de dispositivos de microfluidos se analizan en detalle, por ejemplo, en Unger *et al.* (2000), Science, 288:113-116, y en Chou *et al.* (2000), "Integrated Elastomer Fluidic Lab-on-a-chip-Surface Patterning and DNA Diagnostics", en Proceedings of the Solid State Actuator and Sensor Workshop, Hilton Head, S.C., y en la publicación PCT WO 01/01025.

Brevemente, los anteriores ejemplos de métodos de fabricación implican inicialmente la fabricación de moldes madre para las capas superiores (por ejemplo, la capa elastomérica con los canales de control) y para las capas inferiores (por ejemplo, la capa elastomérica con los canales de flujo) sobre obleas de silicona mediante fotolitografía con compuestos fotorresistentes (Shipley SJR 5740). La altura de los canales puede controlarse con precisión mediante la velocidad de revestimiento por rotación. Los canales de compuestos fotorresistentes se forman exponiendo el compuesto fotorresistente a luz UV, seguido de un revelado. El proceso de reflujo de calor y el tratamiento de protección generalmente pueden lograrse como se describe en M.A. Unger, H.-P. Chou, T. Throsen, A. Scherer, y S.R. Quake, Science (2000), 288:113. Un elastómero de silicona de dos partes mixto (GE RTV 615) entonces se hace rotar en el molde inferior y se vierte sobre el molde superior, respectivamente. El revestimiento por rotación puede utilizarse para controlar el espesor de la capa de fluido polimérico inferior. La capa superior parcialmente curada se despegga del molde después de cocer en la estufa a 80 °C durante 25 minutos, se alinea y se ensambla con la capa inferior. Se emplea un cocido final de 1,5 horas a 80 °C para unir estas dos capas de modo irreversible. Tras despegarse del molde madre inferior de silicona, este dispositivo RTV generalmente se trata con HCl (0,1 M, 30 min a 80 °C). Este tratamiento actúa para romper algunos de los enlaces Si-O-Si, exponiendo con ello a los grupos hidroxilo que hacen que los canales sean más hidrófilos.

El dispositivo después opcionalmente puede ser herméticamente sellado a un soporte. El soporte puede estar fabricado con casi cualquier material, aunque la superficie debe ser plana para asegurar un buen sellado, puesto que el sellado se forma principalmente debido a fuerzas adhesivas. Los ejemplos de soportes adecuados incluyen vidrio, plástico y similares.

Los dispositivos formados según el anterior método resultan en que el sustrato (por ejemplo, lámina de vidrio) forma una pared del canal de flujo. Como alternativa, el dispositivo, tras retirarlo del molde madre, se sella a una membrana elastomérica delgada de modo que el canal de flujo está totalmente encerrado en material elastomérico. El dispositivo elastomérico resultante después puede unirse opcionalmente a un soporte de sustrato.

Formación de capas

En algunos casos, los dispositivos de microfluidos, incluyendo aquellos en que los reactivos se depositan en los sitios de reacción durante la fabricación, pueden estar formados por tres capas. La capa inferior es la capa sobre la cual se depositan los reactivos. La capa inferior puede estar formada por diversos materiales elastoméricos, según se describe en las referencias bibliográficas citadas anteriormente en los métodos de MLS. Generalmente, el material es un elastómero de polidimetilsiloxano (PDMS). Basándose en la disposición y el emplazamiento de los sitios de reacción que se desean para el dispositivo concreto, se pueden determinar las localizaciones sobre la capa inferior

sobre las que deben rociarse los reactivos apropiados. Debido a que el PDMS es hidrófobo, las gotas acuosas depositadas se encogen para formar una gota muy pequeña. Los reactivos opcionalmente depositados se depositan de modo que no se forme un enlace covalente entre el reactivo y la superficie del elastómero porque, tal como se describió anteriormente, se pretende que los reactivos se disuelvan en la disolución de muestra cuando se introduce en el sitio de reacción.

Las otras dos capas del dispositivo son la capa en la que se forman los canales de flujo, y la capa en la que se forman los canales de control y, opcionalmente, de guardia. Estas dos capas se preparan según los métodos generales indicados anteriormente en esta sección. La estructura de dos capas resultante entonces se coloca sobre la parte superior de la primera capa sobre la cual se han depositado los reactivos. Un ejemplo específico de la composición de las tres capas es el siguiente (proporción del componente A al componente B): primera capa (capa de muestras) 30:1 (en peso); segunda capa (capa de los canales de flujo) 30:1; y tercera capa (capa de control) 4:1. Sin embargo, se anticipa que también podrán utilizarse otras composiciones y proporciones de los componentes elastoméricos. Durante este proceso, los sitios de reacción se alinean con los reactivos depositados de modo que los reactivos se colocan dentro del sitio de reacción apropiado.

Según la presente invención, tal como se especifica en las reivindicaciones, puede realizarse un termociclado en los dispositivos de microfluidos. En particular, el termociclado puede utilizarse para ejecutar reacciones de amplificación que faciliten el análisis de la muestra distribuida dentro de las cámaras de reacción.

Una serie de diferentes opciones de diversa sofisticación está disponible para controlar la temperatura dentro de regiones seleccionadas del dispositivo de microfluidos o del dispositivo completo. Así, tal como se emplea en la presente, la expresión controlador de la temperatura pretende referirse, en sentido amplio, a un dispositivo o elemento que puede regular la temperatura del dispositivo de microfluidos completo o de una porción del dispositivo de microfluidos (por ejemplo, de una región de temperatura concreta, o en una o más uniones en una matriz de un dispositivo de microfluidos del tipo de canales ciegos).

En general, los dispositivos se colocan en una placa de termociclado para someter el dispositivo a un termociclado. Una diversidad de dichas placas puede obtenerse con facilidad a partir de fuentes comerciales incluyendo, por ejemplo, ThermoHybaid Px2 (Franklin, MA), MJ Research PTC-200 (South San Francisco, CA), Eppendorf parte nº E5331 (Westbury, NY), Techne parte nº 205330 (Princeton, NJ).

Para asegurar la eficacia de las etapas de termociclado, en ciertos dispositivos resulta útil incorporar detectores para detectar la temperatura en diversas regiones del dispositivo. Una estructura para detectar la temperatura es un termopar. Este termopar puede crearse como una película fina de cables que forman patrones sobre el material de sustrato subyacente, o como cables incorporados directamente sobre el propio material elastómero microfabricado.

Pueden incluirse diversos medios de detección/control de la temperatura en el sistema/dispositivo descrito en la presente. Por ejemplo, la temperatura también puede detectarse mediante un cambio en la resistencia eléctrica. Los materiales termocromáticos son otro tipo de estructuras disponibles para detectar la temperatura en regiones de un dispositivo de amplificación. Otra estrategia para detectar la temperatura es mediante el uso de una cámara de infrarrojos. Otra estrategia para la detección de la temperatura es mediante el uso de detectores piroeléctricos. Otros fenómenos eléctricos, tales como la capacitancia y la inductancia, pueden aprovecharse para detectar la temperatura. Utilizando ecuaciones conocidas para la difusividad térmica y los valores apropiados para los elastómeros y el vidrio utilizados en el dispositivo, se puede calcular el tiempo requerido para que la temperatura dentro del sitio de reacción alcance la temperatura que el controlador desea mantener.

Además de las diversas propiedades y composiciones de materiales potencialmente adecuadas, los dispositivos de microfluidos adecuados para su uso en la presente invención pueden incluir una diversidad de características, diseños, arquitecturas de los canales y similares. Los dispositivos incluirán generalmente una pluralidad de "canales de flujo", que se refieren en general a una ruta de flujo a través del cual puede fluir una disolución. Además, los dispositivos pueden incluir "canales de control", o canales diseñados para formar una interfase con los canales de flujo de forma que pueden utilizarse para impulsar el flujo dentro de los canales de flujo. Los dispositivos también pueden incluir características para regular aún más el flujo de fluidos, tales como una "válvula", que puede incluir una configuración en la que un canal de flujo y un canal de control se cruzan y están separados por una membrana elastomérica que puede desviarse hacia el interior o retraerse del canal de flujo en respuesta a una fuerza de activación. Además, ciertos dispositivos pueden incluir una "vía", que se refiere a un canal formado en el dispositivo elastomérico para proporcionar un acceso fluido entre un puerto externo del dispositivo y uno o más canales de flujo. Por tanto, una vía puede actuar como entrada o salida de muestras, por ejemplo.

Pueden aplicarse numerosos tipos de arquitecturas o diseños de canales. Tal como se ilustra en la figura 2A, un tipo de diseño de canales que puede incluirse en un dispositivo incluye un diseño de canales abiertos. Los "canales abiertos" o "canales de extremo abierto" se refieren a un canal de flujo dispuesto entre vías separadas, de modo que el canal de flujo tiene una entrada separada de una salida. En general, un diseño de red de canales abiertos incluye al menos dos entradas o vías de canales de flujo opuestas, que pueden estar conectadas a aproximadamente uno o a una pluralidad de canales de flujo ramificados para formar una red de canales abiertos. Una o más válvulas formadas por un canal de control adyacente/superpuesto pueden accionarse para aislar regiones discretas de los

canales ramificados para formar sitios de reacción. Estas válvulas proporcionan un mecanismo para aislar, de forma controlable, una pluralidad de sitios de reacción. Tal como se describe en la presente, los dispositivos pueden incluir uno o más canales de flujo abiertos a partir de los cuales se ramifican uno o más canales. Una o más regiones de reacción o sitios de reacción pueden disponerse en cualquier lugar a lo largo de la longitud de un canal de flujo. Una válvula formada por un canal de flujo superpuesto puede accionarse para aislar el sitio o sitios de reacción dispuestos a lo largo del canal, proporcionando con ello un mecanismo para aislar, de forma controlable, los sitios de reacción. Por tanto, cada dispositivo puede incluir un gran número de sitios de reacción (por ejemplo, 10.000+) y puede lograr altas densidades de sitios de reacción, permitiendo con ello una reducción significativa en el tamaño de estos dispositivos comparado con los dispositivos de microfluidos tradicionales. Los diseños de canales abiertos pueden tener, por ejemplo, canales de flujo ramificados a los que puede accederse desde más un emplazamiento/vía. Este aspecto del diseño puede ser particularmente ventajoso, por ejemplo, si un canal/canal de flujo ramificado concreto se obstruye o se bloquea (por ejemplo, debido a variaciones en la fabricación, defectos, etc.), puesto que el fluido puede entrar desde diferentes direcciones y llenar un canal hasta los lados opuestos de un bloqueo u obstrucción concreto. En contraste, un canal al que sólo se pueda acceder desde un único extremo que tenga un bloqueo sólo puede llenarse hasta el punto del bloqueo u obstrucción, y si existen sitios de reacción más allá del bloqueo, estos sitios pueden resultar inutilizados.

Tal como se muestra en la figura 2B, los dispositivos de microfluidos adecuados para su uso según la presente invención pueden utilizar un diseño de "canal ciego" o "relleno ciego". Estos dispositivos se caracterizan en parte por que tienen uno o más canales ciegos, o canales de flujo que tienen un extremo sin salida o un extremo aislado, de modo que la disolución sólo puede entrar y salir del canal ciego por un extremo (es decir, no existe una entrada y una salida distintas para el canal ciego). Estos dispositivos requieren sólo una única válvula para cada canal ciego para aislar una región del canal ciego para formar un sitio de reacción aislado. Durante la fabricación de este tipo de dispositivo, uno o más reactivos para realizar un análisis pueden depositarse opcionalmente en el sitio de reacción, lo cual da como resultado una reducción significativa en el número de entradas y de salidas. Por tanto, puede configurarse una red de canales de flujo en comunicación con los canales ciegos de modo que muchos sitios de reacción puedan llenarse con una única entrada o un número limitado de entradas (por ejemplo, menos de 5 o menos de 10). La capacidad para llenar un canal de flujo ciego es posible porque los dispositivos están fabricados con un material elastomérico suficientemente poroso, de modo que el aire dentro de los canales de flujo y de los canales ciegos puede salir a través de estos poros a medida que la disolución se introduce en los canales. La falta de porosidad de los materiales utilizados en otros dispositivos de microfluidos impide el uso del diseño de canales ciegos, porque el aire en un canal ciego no puede escapar a medida que se inyecta la disolución.

En otro caso, los dispositivos de microfluidos pueden incluir opcionalmente canales de guardia, además de los canales de flujo y de válvulas o canales de control. Para reducir la evaporación de la muestra y de los reactivos desde los dispositivos de microfluidos elastoméricos que se proporcionan en la presente, puede formarse una pluralidad de canales de guardia en los dispositivos. Los canales de guardia son similares a los canales de control porque generalmente se forman en una capa de elastómero superpuesta a los canales de flujo y/o al sitio de reacción. Así, al igual que los canales de control, los canales de guardia están separados de los canales de flujo y/o sitios de reacción subyacentes por una membrana o segmento de un material elastomérico. Sin embargo, a diferencia de los canales de control, los canales de guardia tienen un área de corte transversal considerablemente menor. En general, una membrana con un área más pequeña se desviará menos que una membrana con un área mayor bajo la misma presión aplicada. Los canales de guardia se diseñan para ser presurizados para permitir que la disolución (generalmente agua) pueda fluir hacia el canal de guardia. El vapor de agua que se origina del canal de guardia puede difundirse hacia los poros del elastómero adyacente a un canal de flujo o sitio de reacción, aumentando con ello la concentración de vapor de agua adyacente al canal de flujo o sitio de reacción, y reduciendo la evaporación de la disolución desde estos. Para un análisis más a fondo de los canales de guardia dispuestos en dispositivos de microfluidos y que son adecuados para su uso según la presente invención, véase McBride *et al.*, publicación de solicitud de patente de EEUU nº 20050252773.

Los dispositivos también incluyen una pluralidad de sitios de reacción, o volúmenes de reacción, con los que pueden reaccionar los reactivos, y un dispositivo puede incorporar diversos medios (por ejemplo, bombas y válvulas) para aislar selectivamente sitios de reacción. Los sitios de reacción pueden localizarse en cualquiera de una serie de diferentes emplazamientos dentro del dispositivo.

Debido a que los dispositivos pueden incluir materiales elastoméricos que sean relativamente transparentes ópticamente, las reacciones pueden controlarse con facilidad utilizando una diversidad de diferentes sistemas de detección en casi cualquier emplazamiento en el dispositivo de microfluidos. Cuando se emplean dispositivos de tipo MSL, la detección más habitual se produce en el propio sitio de reacción. El hecho de que estos dispositivos se fabrican con materiales sustancialmente transparentes también significa que pueden emplearse ciertos sistemas de detección con los dispositivos actuales que no podrían utilizarse con los dispositivos de microfluidos con base de silicona tradicionales. La detección puede lograrse utilizando detectores que están incorporados al dispositivo, o que están separados del dispositivo pero alineados con la región del dispositivo que se va a detectar.

En ciertas realizaciones de la presente invención, las reacciones dentro de los volúmenes de reacción se realizan utilizando mezclas o reactivos que primero se mezclan (por ejemplo, se mezclan con la muestra) en una disolución separada del chip y de otros componentes del sistema, y después se introducen en la disolución.

Generalmente los dispositivos se diseñarán y configurarán para realizar reacciones de temperatura controlada, tales como reacciones de amplificación con termociclado. Por tanto, un dispositivo puede configurarse/diseñarse para su uso en reacciones con control de la temperatura (por ejemplo, reacciones de termociclado) dentro de volúmenes de reacción. Un dispositivo o una porción de este, por ejemplo, el dispositivo elastomérico, puede fijarse a un soporte (por ejemplo, una lámina de vidrio). La estructura resultante entonces puede colocarse sobre una placa de control de la temperatura, por ejemplo, para controlar la temperatura en los diversos sitios de reacción. En el caso de las reacciones de termociclado, el dispositivo puede colocarse sobre cualquiera de una serie de placas de termociclado.

Tal como se ilustró anteriormente, el uso opcional de dispositivos de microfluidos para aplicar los métodos de la presente invención puede llevarse a cabo empleando una amplia diversidad de diseños y características del dispositivo. La siguiente descripción describe con más detalle ejemplos de configuraciones que pueden utilizarse para realizar una diversidad de análisis, incluyendo análisis que requieren el control de la temperatura (por ejemplo, reacciones de amplificación de ácidos nucleicos). Sin embargo, debe entenderse que estas configuraciones son ejemplos y que para los expertos en la técnica serán evidentes modificaciones de estos sistemas.

La figura 3 es un diagrama simplificado de un dispositivo de microfluidos. Tal como se ilustra en la figura 3, el dispositivo de microfluidos, también denominado matriz digital, puede incluir un soporte 20, que puede estar fabricado con materiales que proporcionen un soporte mecánico adecuado para los diversos elementos del dispositivo de microfluidos. Como ejemplo, el dispositivo se fabrica utilizando un polímero elastomérico. La porción externa del dispositivo tiene la misma huella que una microplaca de 384 pocillos convencional, y permite un funcionamiento de válvulas autónomo. Tal como se describe a continuación, existen 12 puertos de entrada que se corresponden con 12 entradas de muestra separadas al dispositivo. El dispositivo puede tener 12 paneles 22 y cada uno de los 12 paneles puede contener 765 cámaras de reacción de 6 nl con un volumen total de 4,95 μ l por panel. Los canales de microfluidos 24 pueden conectar las diversas cámaras de reacción sobre los paneles con las fuentes de fluidos según se describe más a fondo a continuación.

Puede aplicarse presión a un acumulador 26 para abrir y cerrar las válvulas que conectan las cámaras de reacción con las fuentes de fluidos. Tal como se ilustra en la figura 3, pueden proporcionarse 12 entradas 28 para cargar la mezcla de reactivos y muestras. Se emplean 48 entradas 28 en algunas aplicaciones para proporcionar una fuente de reactivos, que se suministran al biochip cuando se aplica presión al acumulador 26. En aplicaciones en que no se utilizan reactivos, las entradas 28 y el acumulador lateral de reactivos 26 pueden no utilizarse. Además, se proporcionan dos entradas 30 en el dispositivo ilustrado en la figura 3 para proporcionar hidratación al biochip. Las entradas de hidratación 30 están en comunicación fluida con el dispositivo para facilitar el control de la humedad asociada con las cámaras de reacción. Tal como entenderán los expertos en la técnica, algunos materiales elastoméricos utilizados en la fabricación del dispositivo son permeables a gases, lo cual permite que los gases evaporados o los vapores procedentes de las cámaras de reacción pasen a través del material elastomérico hacia la atmósfera circundante. Los conductos de fluidos localizados en porciones periféricas del dispositivo pueden proporcionar un escudo de líquido de hidratación, por ejemplo, un tampón o mezcla maestra, en porciones periféricas del biochip que rodean los paneles de las cámaras de reacción, reduciendo o evitando con ello la evaporación de los líquidos presentes en las cámaras de reacción. Por tanto, la humedad en las porciones periféricas del dispositivo puede aumentarse añadiendo un líquido volátil, por ejemplo agua, a las entradas de hidratación 30. En un caso específico, una primera entrada está en comunicación fluida con los conductos de fluido de hidratación que rodean los paneles sobre un primer lateral del biochip, y la segunda entrada está en comunicación fluida con los conductos de fluido de hidratación que rodean los paneles sobre el otro lateral del biochip.

Aunque los dispositivos y la distribución de la muestra descritos anteriormente son un ejemplo de sistema para realizar los métodos de la presente invención, los expertos en la técnica reconocerán muchas variaciones, modificaciones y alternativas para diseñar los dispositivos para microfluidos descritos en la presente. Por ejemplo, aunque el dispositivo de microfluidos ilustrado en la figura 2 incluye 12 paneles, cada uno con 765 cámaras de reacción con un volumen de 6 nl por cámara de reacción, esto no es necesario para la presente invención. La geometría concreta de la matriz digital dependerá de las aplicaciones concretas. Así, el dispositivo, por ejemplo, no se limita a las matrices digitales con 12 paneles que tienen 765 cámaras de reacción, sino que se incluyen otras combinaciones. Otra descripción relacionada con matrices digitales adecuada para su uso en realizaciones de la presente invención se proporciona en la publicación de solicitud de patente de EEUU nº 2005/0252773.

El ensayo de grandes cantidades de muestras replicadas puede requerir cantidades significativas de reactivos. En una realización de la presente invención, se realiza una PCR digital en microvolúmenes. Las cámaras de reacción para realizar una PCR de volumen pequeño pueden ser de aproximadamente 2 nl a aproximadamente 500 nl. Cuanto más pequeño sea el volumen de la cámara de reacción, mayor será el número de ensayos individuales que se puedan hacer (utilizando diferentes conjuntos de sondas y cebadores, o como replicados de los mismos conjuntos de sondas y cebadores, o cualquier combinación de una serie de replicados y de una serie de ensayos diferentes). En una realización, la cámara de reacción es de aproximadamente 2 nl a aproximadamente 50 nl, preferiblemente de 2 nl a aproximadamente 25 nl, más preferiblemente de aproximadamente 4 nl a aproximadamente 15 nl. En algunas realizaciones, el volumen de la cámara de reacción es de aproximadamente 4 nl, aproximadamente 5 nl, aproximadamente 6 nl, aproximadamente 7 nl, aproximadamente 8 nl, aproximadamente 9 nl, aproximadamente 10 nl, aproximadamente 11 nl, o aproximadamente 12 nl. Las cámaras de las muestras

pueden fabricarse de vidrio, plástico, silicona, polímeros elastoméricos tales como polidimetilsiloxano, poliuretano u otros polímeros. Las muestras procesadas mediante el método de la invención son adecuadas para su uso en un análisis del número de copias variable empleando el sistema BioMark™ (Fluidigm Corporation, South San Francisco, CA). El sistema BioMark™ utiliza un dispositivo de microfluidos de polidimetilsiloxano que proporciona la ejecución de múltiples ensayos sobre múltiples muestras.

Los dispositivos de microfluidos Fluidigm (matrices digitales) están fabricados por Fluidigm Corporation (South San Francisco, CA). Los chips se fabrican siguiendo la metodología de litografía blanda de múltiples capas (MSL) (Unger, M.A., Chou, H.P., Thorsen, T., Scherer, A., Quake, S.R., Monolithic microfabricated valves and pumps by multilayer soft lithography, Science, 2000, 288:113-116). El chip tiene canales de muestras que tienen una profundidad semielíptica media de 10 µm, una anchura de 70 µm, con un espaciado paralelo de 200 µm sobre el centro. Los microfluidos de muestras están fabricados mediante un proceso de molde de dos capas para crear cámaras de división de 265 µm (profundidad) x 150 µm x 150 µm dispuestas a lo largo de cada canal de muestras. En una capa de silicona separada, los canales de control del chip tienen un recorrido perpendicular a los canales de muestras. Las intersecciones de los canales forman válvulas deflectoras para dirigir a los fluidos. Tras la presurización de los canales de control, una membrana fina entre las capas cierra los canales de muestras para aislar cámaras de división individuales. Los canales de control tienen una profundidad de 15 µm, una anchura de 50 µm con un espaciado paralelo de 300 µm sobre el centro.

Las mezclas de reacción, tales como mezclas de PCR, mezclas de muestras, mezclas de muestras de productos de la preamplificación, se cargan en cada panel y se reparten aleatoriamente moléculas individuales de ADN en las diversas cámaras de reacción. Después de cargar los paneles y las cámaras de reacción, la matriz digital puede termociclarse y después formarse imágenes en un lector apropiado, por ejemplo un instrumento BioMark™ que ofrece el presente cesionario. Los datos producidos se analizan utilizando un programa informático para el análisis de PCR digital que ofrece el presente cesionario u otro programa informático de análisis adecuado.

Las figuras 4A-4C son diagramas simplificados de una porción de dispositivo/biochip ilustrado en la figura 3. La figura 4A ilustra los 12 paneles 22, y cada uno de los paneles incluye un número de cámaras de reacción. La figura 4B ilustra la geometría de una serie de cámaras de reacción 40 contenidas en un panel. Las cámaras de reacción 40 están espaciadas sobre centros de 200 µm, según se ilustra. La figura 4C ilustra una imagen de fluorescencia de una porción de un panel. El lado izquierdo de la ilustración es una sección de control, ilustrándose todas las cámaras de reacción en oscuro. El lado derecho de la ilustración muestra cómo en un experimento típico, muchas de las cámaras de reacción están oscuras 42, y no generan una emisión fluorescente significativa. Sin embargo, una porción de las cámaras de reacción presentan emisión fluorescente, lo cual indica una cámara de reacción "positiva" 44. Tal como se describió anteriormente en la figura 2B, los canales de muestras tienen un recorrido de izquierda a derecha conectando cámaras de reacción individuales, y los canales de control tienen un recorrido de arriba abajo en la capa superior. Tras la presurización de los canales de control, una membrana fina entre las capas cierra los canales de muestras para aislar las cámaras de reacción individuales. Las válvulas dividen las cámaras individuales que se mantienen cerradas durante el experimento de PCR.

Tal como se describe más a fondo a lo largo de la presente solicitud, el chip se termocicló y se formaron imágenes en un sistema de PCR a tiempo real BioMark™ que ofrece el presente cesionario, y se utilizó un programa informático de análisis de PCR digital, tal como el análisis de PCR digital BioMark™ que ofrece el presente cesionario, para contar el número de cámaras positivas en cada panel. Cuando se emplean dos ensayos con dos tintes fluorescentes en una reacción de PCR digital en forma múltiplex pueden cuantificarse independientemente dos genes. Esta capacidad para cuantificar independientemente genes se emplea según se describe en la presente para estudiar las variaciones en el número de copias utilizando la matriz digital. El número de genes que pueden cuantificarse independientemente en una única reacción de PCR depende del número de tintes fluorescentes y filtros disponibles.

Según se describió en las etapas de métodos generales anteriormente, tras la distribución de la muestra, otras etapas incluyen una etapa de amplificación seguida de la detección y el análisis de los resultados. En algunas realizaciones de la presente invención, la amplificación y la detección/análisis pueden realizarse utilizando métodos que coordinan las dos etapas entre sí, por ejemplo una PCR cuantitativa. En general, los polinucleótidos que se aíslan dentro de cada sitio de reacción pueden amplificarse, detectarse y analizarse utilizando una gama de estrategias posibles. Un ejemplo de estrategia implica amplificar los polinucleótidos diana y de referencia de modo que el producto amplificado pueda utilizarse para determinar una concentración del polinucleótido diana y una concentración del polinucleótido de referencia. Para realizar la amplificación, los reactivos necesarios para la amplificación se combinan con la muestra, y pueden incluir una primera sonda que se hibrida selectivamente con un polinucleótido diana y una segunda sonda que se hibrida selectivamente con un polinucleótido de referencia bajo condiciones que son adecuadas para la amplificación de polinucleótidos. La primera y la segunda sonda pueden incluir diferentes marcadores detectables, para diferenciar entre los productos de la amplificación de los polinucleótidos diana y de referencia. Además, la diferenciación de los polinucleótidos diana y de referencia puede posibilitar el cálculo posterior de la concentración de moléculas nucleotídicas diana como una proporción de las moléculas nucleotídicas de referencia para determinar el número de copias relativo de la secuencia polinucleotídica diana en el genoma del sujeto.

Las etapas generales de una amplificación seguida de una detección y un análisis pueden realizarse mediante una serie de formas.

Para aumentar la comprensión de los métodos y de los sistemas descritos a lo largo de la memoria descriptiva, a continuación se describen en general los términos y las expresiones de la técnica. El término “reactivo” se refiere, en sentido amplio, a cualquier agente utilizado en una reacción. Un reactivo puede incluir un único agente que en sí mismo pueda controlarse (por ejemplo, una sustancia que pueda controlarse a medida que se calienta) o una mezcla de dos o más agentes. Un reactivo puede estar vivo (por ejemplo, una célula) o no vivo. Los ejemplos de reactivos para la reacción de amplificación de ácidos nucleicos incluyen, pero no se limitan a tampón, iones metálicos, polimerasa, cebadores, ácidos nucleicos de molde, nucleótidos, marcadores, tintes, nucleasas y similares. Los reactivos para las reacciones enzimáticas incluyen, por ejemplo, sustratos, cofactores, enzimas acoplantes, tampón, iones metálicos, inhibidores y activadores. Los reactivos para reacciones basadas en células incluyen, pero no se limitan a células, tintes específicos de células, y ligandos (por ejemplo, agonistas y antagonistas) que se unen a receptores celulares. Los reactivos pueden incluirse en la disolución de muestra, u opcionalmente pueden inmovilizarse de una diversidad de formas (por ejemplo, de modo covalente, no covalente, a través de moléculas conectoras adecuadas). En las reacciones de amplificación de ácidos nucleicos en chip, por ejemplo, uno o más reactivos utilizados para realizar las reacciones de extensión pueden depositarse (por ejemplo, mediante rociado) en cada uno de los sitios de reacción durante la fabricación del dispositivo.

El término “marcador” se refiere a una molécula o un aspecto de una molécula que puede detectarse mediante técnicas físicas, químicas, electromagnéticas y otras técnicas analíticas relacionadas. Los ejemplos de marcadores detectables que pueden utilizarse incluyen, pero no se limitan a radioisótopos, fluoróforos, cromóforos, marcadores de masa, partículas electrodensas, partículas magnéticas, marcadores de espín, moléculas que emiten quimioluminiscencia, moléculas electroquímicamente activas, enzimas, cofactores, enzimas ligados a sondas de ácidos nucleicos, y sustratos de enzimas. La expresión “marcado de modo detectable” significa que un agente se ha conjugado con un marcador, o que un agente tiene algunas características inherentes (por ejemplo, tamaño, forma o color) que permite que sea detectado sin tener que estar conjugado con un marcador distinto.

La expresión “ácido nucleico”, y los términos “polinucleótido” y “oligonucleótido” se emplean en la presente para incluir una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud que incluyen, pero no se limitan a ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos. No hay una distinción intencionada en la longitud entre estos términos y expresión. Además, estos términos y expresión se refieren sólo a la estructura primaria de la molécula. Por tanto, en ciertas realizaciones, estos términos y expresión pueden incluir ADN monocatenario, bicatenario y tricatenario, así como ARN monocatenario, bicatenario y tricatenario. También incluyen modificaciones, tales como mediante metilación y/o formación de casquetes, y las formas no modificadas del polinucleótido. Más en concreto, la expresión “ácido nucleico”, y los términos “polinucleótido” y “oligonucleótido” incluyen polidesoxirribonucleótidos (que contienen 2-desoxi-D-ribosa), polirribonucleótidos (que contienen D-ribosa), cualquier otro tipo de polinucleótido que sea un N- o C-glicósido de una base de purina o de pirimidina, y otros polímeros que contienen esqueletos no nucleotídicos, por ejemplo, polímeros de poliamida (por ejemplo, ácido nucleicos peptídicos (PNA)) y de polimorfolino (disponibles en el mercado en Anti-Virals, Inc., Corvallis, Oregón, como Neugene), y otros polímeros de ácidos nucleicos de secuencia específica sintéticos con la condición de que los polímeros contengan nucleobases en una configuración que permita el apareamiento de bases y el apilamiento de bases, tal como aparecen en el ADN y ARN.

Una “sonda” es un ácido nucleico capaz de unirse a un ácido nucleico diana con una secuencia complementaria a través de uno o más tipos de enlaces químicos, habitualmente a través de apareamiento de bases complementarias, normalmente a través de la formación de enlaces de hidrógeno, formando con ello una estructura en dúplex. La sonda se une o se hibrida con un “sitio de unión a la sonda”. La sonda puede marcarse con un marcador detectable para permitir una detección fácil de la sonda, en particular después de que la sonda se haya hibridado con su diana complementaria. El marcador unido a la sonda puede incluir cualquiera de una diversidad de marcadores diferentes conocidos en la técnica que pueden detectarse por medios químicos o físicos, por ejemplo. Los marcadores adecuados que pueden unirse a sondas incluyen, pero no se limitan a radioisótopos, fluoróforos, cromóforos, marcadores de masa, partículas electrodensas, partículas magnéticas, marcadores de espín, moléculas que emiten quimioluminiscencia, moléculas electroquímicamente activas, enzimas, cofactores, y sustratos de enzimas. Las sondas pueden variar significativamente en tamaño. Algunas sondas son relativamente cortas. En general, las sondas tienen una longitud de al menos 7 a 15 nucleótidos. Otras sondas tienen una longitud de al menos 20, 30 o 40 nucleótidos. Otras sondas son un poco más largas, y tienen una longitud de al menos 50, 60, 70, 80, 90 nucleótidos. Otras sondas son aún más largas, y tienen una longitud de al menos 100, 150, 200 o mas nucleótidos. Las sondas también pueden tener cualquier longitud que esté dentro de los anteriores intervalos.

Un “cebador” es un polinucleótido monocatenario capaz de actuar como punto de inicio de la síntesis de ADN dirigida por moldes bajo condiciones apropiadas (es decir, en presencia de cuatro nucleósido trifosfatos diferentes y un agente para la polimerización, tal como ADN o ARN polimerasa o transcriptasa inversa) en un tampón apropiado y a una temperatura adecuada. La longitud aproximada de un cebador depende del uso previsto del cebador, pero generalmente tiene una longitud de al menos 7 nucleótidos, y de forma más típica su longitud varía de 10 a 30 nucleótidos. Otros cebadores son un poco más largos, tal como una longitud de 30 a 50 nucleótidos. Las moléculas de cebadores cortas en general requieren una temperaturas más frías para formar complejos híbridos suficientemente estables con el molde. No es necesario que un cebador refleje la secuencia exacta del molde, pero

debe ser lo suficientemente complementario para hibridarse con un molde. La expresión "sitio del cebador" o "sitio de unión al cebador" se refiere al segmento del ADN diana al cual se hibrida un cebador. La expresión "par de cebadores" significa un conjunto de cebadores que incluye un "cebador cadena arriba" 5' que se hibrida con el complemento del extremo 5' de la secuencia de ADN que se va a amplificar, y un "cebador cadena abajo" 3' que se hibrida con el extremo 3' de la secuencia que se va a amplificar.

Un cebador que es "perfectamente complementario" tiene una secuencia totalmente complementaria a lo largo de la longitud completa del cebador y no tiene desapareamientos. El cebador generalmente es perfectamente complementario a una porción (subsecuencia) de una secuencia diana. Un "desapareamiento" se refiere a un sitio en que el nucleótido en el cebador y el nucleótido en el ácido nucleico diana con el que se alinea no son complementarios. La expresión "sustancialmente complementario", cuando se emplea con referencia a un cebador, significa que un cebador no es perfectamente complementario con su secuencia diana; en lugar de ello, el cebador sólo es suficientemente complementario para hibridarse selectivamente con su respectiva hebra en el sitio de unión al cebador deseado.

El término "complementario" significa que un ácido nucleico se idéntico, o se hibrida selectivamente con otra molécula de ácido nucleico. La selectividad de la hibridación existe cuando se produce una hibridación que es más selectiva que la falta total de especificidad. Generalmente la hibridación selectiva se produce cuando existe al menos aproximadamente 55% de coincidencia a lo largo de un tramo de al menos 14-25 nucleótidos, preferiblemente al menos 65%, más preferiblemente al menos 75%, y lo más preferiblemente al menos 90%. Preferiblemente, un ácido nucleico se hibrida específicamente con el otro ácido nucleico. Véase M. Kanehisa, *Nucleic Acids Res.*, 12:203 (1984).

La detección se produce en una "sección de detección" o "región de detección". Estas expresiones y otras relacionadas se refieren a la porción del dispositivo de microfluidos en la que se produce la detección. Tal como se indicó anteriormente, con los dispositivos que emplean ciertos diseños (por ejemplo, diseños de canales abiertos, diseños de canales ciegos, etc.), la sección de detección es, en general, el sitio de reacción aislado por la válvula asociada con cada sitio de reacción. La sección de detección para los dispositivos con una base de matriz normalmente está dentro de regiones de los canales de flujo que están adyacentes a una intersección, en la propia intersección, o en una región que incluye la intersección y una región circundante.

Tal como se analizó anteriormente, un ejemplo de análisis de la variación en el número de copias puede realizarse utilizando métodos de PCR cuantitativa en chip. En particular, la PCR cuantitativa puede implicar tanto la amplificación de los polinucleótidos como la detección/análisis de los productos amplificados. Además de la PCR cuantitativa también puede utilizarse una diversidad de los denominados métodos de "amplificación a tiempo real" o métodos de "PCR cuantitativa a tiempo real" para determinar la cantidad de ácido nucleico diana presente en una muestra midiendo la cantidad de producto de la amplificación formado durante o después del propio proceso de amplificación. Los ensayos con nucleasa fluorogénicos son un ejemplo específico de un método de cuantificación a tiempo real que puede utilizarse con éxito con los dispositivos descritos en la presente. Este método para controlar la formación del producto de la amplificación implica la medición continua de la acumulación de los productos de la PCR utilizando una sonda oligonucleotídica fluorogénica marcada de forma dual, una estrategia que en la bibliografía se denomina con frecuencia método "TaqMan".

La sonda utilizada en estos ensayos generalmente es un polinucleótido corto (por ejemplo, aproximadamente 20-25 bases) que está marcado con dos tintes fluorescentes diferentes. El terminal 5' de la sonda generalmente está unido a un tinte indicador, y el terminal 3' está unido a un tinte extintor, aunque los tintes también pueden estar unidos a otros emplazamientos sobre la sonda. La sonda se diseña para que tenga una complementariedad de secuencia al menos sustancial con el sitio de unión a la sonda sobre el ácido nucleico diana. También se incluyen en la mezcla de reacción cebadores de PCR cadena arriba y abajo que se unen a regiones que flanquean al sitio de unión a la sonda.

Cuando la sonda está intacta, se produce la transferencia de energía entre los dos fluoróforos y el extintor extingue la emisión desde el indicador. Durante la fase de extensión de la PCR, la sonda se rompe por la actividad 5' nucleasa de una ácido nucleico polimerasa, tal como Taq polimerasa, liberando así el indicador del polinucleótido-extintor, y dando como resultado un aumento en la intensidad de emisión del indicador que puede ser medida mediante un detector apropiado.

Un detector que está específicamente adaptado para medir emisiones de fluorescencia, tales como las creadas durante un ensayo fluorogénico es el ABI 7700 fabricado por Applied Biosystems, Inc., en Foster City, CA. El programa informático suministrado junto con el instrumento es capaz de registrar la intensidad de fluorescencia del indicador y extintor a lo largo de la amplificación. Estos valores registrados entonces pueden utilizarse para calcular el aumento en la intensidad de emisión del indicador normalizada sobre una base continua y, en último término, cuantificar la cantidad de ARNm que se está amplificando.

Otros detalles con respecto a la teoría y el funcionamiento de los métodos fluorogénicos para realizar determinaciones a tiempo real de la concentración de los productos de la amplificación se describen, por ejemplo, en las patentes de EEUU nº 5.210.015 de Gelfand, 5.538.848 de Livak, *et al.*, y 5.863.736 de Haaland, así como en

Heid, C.A., *et al.*, *Genome Research*, 6:986-994 (1996); Gibson, U.E.M., *et al.*, *Genome Research*, 6:995-1001 (1996); Holland, P.M., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:7276-7280 (1991); y Livak, K.J., *et al.*, *PCR Methods and Applications*, 357-362 (1995). Así, a medida que avanza la reacción de amplificación, una cantidad cada vez mayor de tinte se une y esto se ve acompañado de un aumento concomitante en la señal.

5 Cuando se realizan los ensayos de amplificación en chips, pueden realizarse amplificaciones en forma múltiplex dentro de un único sitio de reacción, por ejemplo, utilizando una pluralidad de cebadores, cada uno específico para un ácido nucleico diana de interés concreto (por ejemplo, una secuencia polinucleotídica diana y una secuencia polinucleotídica de referencia), durante el proceso de termociclado. La presencia de diferentes productos amplificados puede detectarse utilizando sondas marcadas de modo diferenciado para realizar una reacción de RT-PCR cuantitativa, o utilizando balizas moleculares marcadas de modo diferenciado (véase anteriormente). En estas estrategias, cada sonda marcada de modo diferenciado se diseña para que se hibride sólo con una diana amplificada concreta. Mediante la elección sensata de los diferentes marcadores que se utilizan pueden realizarse análisis en los que los diferentes marcadores se excitan y/o se detectan a diferentes longitudes de onda en una única reacción. Otras indicaciones con respecto a la selección de marcadores fluorescentes apropiados que son adecuados en estas estrategias se incluyen en *Fluorescence Spectroscopy* (Pesce *et al.*, eds.), Marcel Dekker, Nueva York (1971); White *et al.*, *Fluorescence Analysis: A Practical Approach*, Marcel Dekker, Nueva York (1970); Berlman, *Handbook of Fluorescence Spectra of Aromatic Molecules*, 2ª ed., Academic Press, Nueva York (1971); Griffiths, *Colour and Constitution of Organic Molecules*, Academic Press, Nueva York (1976); *Indicators* (Bishop, ed.), Pergamon Press, Oxford, 19723; y Haugland, *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*, Molecular Probes, Eugene (1992).

25 Cuando se utilizan dispositivos de microfluidos, tales como dispositivos con diseño de canales abiertos o de canales ciegos, para realizar las reacciones de amplificación de ácidos nucleicos, los reactivos que pueden depositarse dentro de los sitios de reacción son los reactivos necesarios para realizar el tipo deseado de reacción de amplificación. Habitualmente, esto significa que algunos o todos los siguientes se depositan: cebadores, polimerasa, nucleótidos, iones metálicos, tampón, y cofactores, por ejemplo. La muestra introducida en el sitio de reacción en estos casos es el molde de ácido nucleico. Sin embargo, como alternativa, el molde puede depositarse y los reactivos de amplificación hacerse fluir hacia los sitios de reacción. Cuando se utiliza el dispositivo de matriz para realizar una reacción de amplificación, las muestras que contienen el molde de ácido nucleico pueden hacerse fluir a través de los canales de flujo verticales, y los reactivos de amplificación a través de los canales de flujo horizontales, o viceversa.

35 En general, pueden realizarse múltiples análisis de genotipificación y expresión, por ejemplo, en cada sitio de reacción. La muestra que contiene el ADN diana puede introducirse en los sitios de reacción de un dispositivo de microfluidos. Para los métodos de PCR cuantitativa, tales como TaqMan®, los cebadores para amplificar diferentes regiones de un ADN diana de interés se incluyen dentro de un único sitio de reacción. Se emplean sondas para cada región marcadas de modo diferenciado para distinguir el producto que se forma, por ejemplo los polinucleótidos diana y de referencia. Si el alelo con el que la sonda es complementaria está presente en el ADN diana entonces se produce la amplificación, dando como resultado con ello una señal detectable. Basándose en cuál es la señal diferente obtenida, puede determinarse la identidad del nucleótido en el sitio polimórfico. Si ambas señales se detectan, entonces ambos alelos están presentes. Se realiza un termociclado durante la reacción según se describe en la sección de control de la temperatura anterior.

45 En algunas realizaciones de la presente invención, pueden incluirse como reactivos sondas marcadas de modo diferenciado complementarias con cada una de las formas alélicas, junto con cebadores, nucleótidos y polimerasa. Sin embargo, las reacciones pueden realizarse sólo con una única sonda, aunque esto puede crear una ambigüedad con respecto a si una falta de señal es debida a la ausencia de un alelo concreto o simplemente a una reacción fallida. Para el caso bialélico típico, en el que son posibles dos alelos para un sitio polimórfico, normalmente se incluyen en la mezcla de reacción dos sondas marcadas de modo diferenciado, cada una perfectamente complementaria con uno de los alelos, junto con cebadores de la amplificación, nucleótidos y polimerasa.

50 Tal como se indica en la figura 4C, la señal de cada sitio de reacción puede detectarse y después analizarse para determinar información acerca de la muestra. Por ejemplo, las muestras procesadas mediante los métodos de la invención son muy adecuadas para su uso en un análisis del número de copias variable utilizando el sistema BioMark™ (Fluidigm Corporation, South San Francisco, CA) y el sistema de termociclado con formación de imágenes de fluorescencia BioMark™. El sistema BioMark™ utiliza un dispositivo de microfluidos de polidimetilsiloxano que posibilita la ejecución de múltiples ensayos sobre múltiples muestras.

55 Tal como se describe más a fondo a lo largo de la presente descripción, el chip, en algunas realizaciones, puede termociclarse y se pueden formar imágenes en el sistema de PCR a tiempo real BioMark™ que ofrece el presente cesionario, y se emplea un programa de análisis de PCR digital, tal como el análisis de PCR digital BioMark™, que ofrece el presente cesionario, para contar el número de cámaras positivas en cada panel. Cuando se emplean dos ensayos con dos tintes fluorescentes en una reacción de PCR digital en forma múltiplex pueden cuantificarse dos genes de modo independiente. Esta capacidad para cuantificar genes de modo independiente se emplea según se describe en la presente para estudiar las variaciones en el número de copias utilizando la matriz digital.

Tal como se describe en general anteriormente, las mezclas de reacción, tales como las mezclas de PCR, pueden cargarse en cada panel y pueden repartirse aleatoriamente moléculas individuales de ADN en las diversas cámaras de reacción. Después de cargar los paneles y las cámaras de reacción, la matriz digital se termocicla y después se forman imágenes en un lector apropiado, por ejemplo, un instrumento BioMark™ que ofrece el presente cesionario.

- 5 Los datos producidos se analizan utilizando el programa informático de análisis de PCR digital que ofrece el presente cesionario u otro programa informático de análisis adecuado.

Tal como se describió anteriormente, puede utilizarse una PCR cuantitativa en chip para realizar ciertas realizaciones de la presente invención. No obstante puede utilizarse una serie de estrategias de detección diferentes con los dispositivos de microfluidos descritos anteriormente. La selección del sistema apropiado depende en parte

- 10 del tipo de dispositivo, acontecimiento y/o agente que se está detectando. Los detectores pueden diseñarse para detectar una serie de diferentes tipos de señales que incluyen, pero no se limitan a señales procedentes de radioisótopos, fluoróforos, cromóforos, partículas electrodensas, partículas magnéticas, marcadores de espín, moléculas que emiten quimioluminiscencia, moléculas electroquímicamente activas, enzimas, cofactores, enzimas ligados a sondas de ácidos nucleicos, y sustratos de enzimas.

- 15 Los ejemplos de metodologías de detección incluyen, pero no se limitan a dispersión de luz, detección de fluorescencia multicanal, absorción en la longitud de onda UV y visible, luminiscencia, reflectividad diferencial, y dispersión de láser confocal. Otros métodos de detección que pueden utilizarse en ciertas aplicaciones incluyen técnicas de ensayo de proximidad de centelleo, detección radioquímica, polarización de fluorescencia, espectroscopía de correlación de fluorescencia (FCS), transferencia de energía con resolución temporal (TRET),
- 20 transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET) y variaciones, tales como transferencia de energía de resonancia de bioluminiscencia (BRET). Otras opciones de detección incluyen resistencia eléctrica, resistividad, impedancia, y detección de voltaje.

La sección de detección puede estar en comunicación con uno o más microscopios, diodos, dispositivos estimuladores de luz (por ejemplo, láseres), tubos fotomultiplicadores, procesadores y combinaciones de los

- 25 anteriores, que cooperan para detectar una señal asociada con un acontecimiento y/o agente concreto. A menudo, la señal que se está detectando es una señal óptica que es detectada en la sección de detección por un detector óptico. El detector óptico puede incluir uno o más fotodiodos (por ejemplo, fotodiodos de avalancha), una guía de luz de fibra óptica que conduzca, por ejemplo, a un tubo fotomultiplicador, un microscopio y/o una cámara de video (por ejemplo, una cámara CCD).

Los detectores pueden microfabricarse dentro del dispositivo de microfluidos, o pueden ser un elemento separado. Si el detector existe como un elemento separado y el dispositivo de microfluidos incluye una pluralidad de secciones de detección, la detección puede producirse dentro de una única sección de detección en cualquier momento dado. Como alternativa, pueden utilizarse sistemas de detección. Por ejemplo, ciertos sistemas automáticos barren la fuente de luz relacionada con el dispositivo de microfluidos; otros sistemas barren la luz emitida sobre un detector, o

- 35 incluyen un detector multicanal. Como ejemplo ilustrativo específico, el dispositivo de microfluidos puede unirse a una etapa traducible y barrerse bajo el objetivo de un microscopio. Una señal adquirida de esta manera entonces se envía a un procesador para la interpretación y el procesamiento de la señal. También pueden utilizarse matrices de tubos fotomultiplicadores. Además pueden emplearse sistemas ópticos que tienen la capacidad de recoger señales de todos los sistemas de detección diferentes simultáneamente mientras se determina la señal de cada sección.

Pueden utilizarse detectores externos porque los dispositivos proporcionados están fabricados por completo o en gran parte con materiales que son ópticamente transparentes a la longitud de onda que se está controlando. Esta característica permite a los dispositivos descritos en la presente utilizar una serie de sistemas de detección ópticos que no sería posible utilizar con dispositivos de microfluidos basados en silicio convencionales.

- 40 Pueden utilizarse detectores externos porque los dispositivos proporcionados están fabricados por completo o en gran parte con materiales que son ópticamente transparentes a la longitud de onda que se está controlando. Esta característica permite a los dispositivos descritos en la presente utilizar una serie de sistemas de detección ópticos que no sería posible utilizar con dispositivos de microfluidos basados en silicio convencionales.

En un caso, un detector emplea una cámara CCD y un paso óptico que proporciona un amplio campo de visión y una alta apertura numérica para maximizar la cantidad de luz recogida desde cada cámara de reacción. A este respecto, la CCD se utiliza como una matriz de fotodetectores en la que cada pixel o grupo de píxeles se corresponde con una cámara de reacción, en lugar de ser utilizada para producir una imagen de la matriz. Por tanto, la óptica puede alterarse de modo que se reduce la calidad de la imagen o se desenfoca para aumentar la profundidad de campo del sistema óptico para recoger más luz desde cada cámara de reacción.

- 45 En un caso, un detector emplea una cámara CCD y un paso óptico que proporciona un amplio campo de visión y una alta apertura numérica para maximizar la cantidad de luz recogida desde cada cámara de reacción. A este respecto, la CCD se utiliza como una matriz de fotodetectores en la que cada pixel o grupo de píxeles se corresponde con una cámara de reacción, en lugar de ser utilizada para producir una imagen de la matriz. Por tanto, la óptica puede alterarse de modo que se reduce la calidad de la imagen o se desenfoca para aumentar la profundidad de campo del sistema óptico para recoger más luz desde cada cámara de reacción.

Un detector puede incluir una fuente de luz para estimular un indicador que genera una señal detectable. El tipo de fuente de luz utilizada dependerá, en parte, de la naturaleza del indicador que se está activando. Las fuentes de luz adecuadas incluyen, pero no se limitan a láseres, diodos de láser, y bombillas de alta intensidad. Si se utiliza un láser, este puede emplearse para barrer un conjunto de secciones de detección o una única sección de detección. Los diodos de láser pueden microfabricarse en el propio dispositivo de microfluidos. Como alternativa, los diodos de

- 50 Un detector puede incluir una fuente de luz para estimular un indicador que genera una señal detectable. El tipo de fuente de luz utilizada dependerá, en parte, de la naturaleza del indicador que se está activando. Las fuentes de luz adecuadas incluyen, pero no se limitan a láseres, diodos de láser, y bombillas de alta intensidad. Si se utiliza un láser, este puede emplearse para barrer un conjunto de secciones de detección o una única sección de detección. Los diodos de láser pueden microfabricarse en el propio dispositivo de microfluidos. Como alternativa, los diodos de láser pueden fabricarse en otro dispositivo que se coloca adyacente al dispositivo de microfluidos que se está utilizando para realizar una reacción de termociclado, de modo que la luz de láser procedente del diodo se dirige a la sección de detección.
- 55 Los diodos de láser pueden fabricarse en otro dispositivo que se coloca adyacente al dispositivo de microfluidos que se está utilizando para realizar una reacción de termociclado, de modo que la luz de láser procedente del diodo se dirige a la sección de detección.

La detección puede implicar también una serie de estrategias no ópticas. Por ejemplo, el detector también puede incluir, por ejemplo, un detector de temperatura, un detector de conductividad, un detector potenciométrico (por

ejemplo, un electrodo de pH) y/o un detector amperométrico (por ejemplo, para controlar las reacciones de oxidación y reducción).

Puede emplearse una serie de detectores externos disponibles en el mercado. Muchos de estos son detectores fluorescentes por la facilidad de preparar reactivos marcados de modo fluorescente. Los ejemplos específicos de detectores que están disponibles incluye, pero no se limitan a Applied Precision ArrayWoRx (Applied Precision, Issaquah, WA).

En algunas realizaciones se emplean métodos de detección basados en FRET. Los métodos de detección de este tipo implican detectar un cambio en la fluorescencia desde un fluoróforo donador (indicador) y/o aceptor (extintor) en una pareja de fluoróforos de donador/aceptor. La pareja de fluoróforos de donador y aceptor se selecciona de modo que el espectro de emisión del donador se solape con el espectro de excitación del aceptor. Así, cuando la pareja de fluoróforos se acercan lo suficiente, puede producirse la transferencia de energía desde el donador al aceptor. Esta transferencia de energía puede detectarse. Véase la patente de EEUU nº 5.945.273, y la publicación PCT WO 97/22719.

Las balizas moleculares proporcionan una estrategia particularmente eficaz. Con las balizas moleculares, un cambio en la conformación de la sonda a medida que se hibrida con una región complementaria del producto amplificado da como resultado la formación de una señal detectable. La propia sonda incluye dos secciones: una sección en el extremo 5' y otra sección en el extremo 3'. Estas secciones flanquean la sección de la sonda que se aparea con el sitio de unión a la sonda y son complementarias entre sí. Una sección terminal generalmente está asociada con un tinte indicador, y la otra sección terminal habitualmente está unida a un tinte extintor.

En disolución, las dos secciones terminales pueden hibridarse entre sí para formar un bucle de horquilla. En esta conformación, los tintes indicador y extintor están lo suficientemente cerca para que la fluorescencia desde el tinte indicador pueda ser extinguida de modo eficaz por el tinte extintor. En contraste, la sonda hibridada produce una conformación linealizada en la que el grado de extinción disminuye. Por tanto, mediante el control de los cambios de emisión en los dos tintes es posible controlar indirectamente la formación del producto de la amplificación. Las sondas de este tipo y los métodos para su uso se describen más a fondo, por ejemplo, en Piatek, A.S. *et al.*, Nat. Biotechnol., 16:359-363 (1998); Tyagi, S. y Kramer, F.R., Nature Biotechnology, 14:303-308 (1996); y Tyagi, S. *et al.*, Nat. Biotechnol., 16:49-53 (1998).

Otros métodos de amplificación/detección muy conocidos (como ilustración y no como limitación) incluyen *Invader* (véase Neri, B.P. *et al.*, *Advances in Nucleic Acid and Protein Analysis*, 3826:117-125, 2000); *Nasba* (véase, por ejemplo, Compton, J., Nucleic Acid Sequence-based Amplification, *Nature*, 350:91-91, 1991); *Scorpion* (véase Thelwell, N. *et al.*, Nucleic Acids Research, 28:3752-3761, 2000); y detección de ADN capacitativa (véase, por ejemplo, Sohn *et al.*, 2000, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97:10687-10690).

Tal como se indicó anteriormente, los métodos de la presente invención incluyen realizar diversas reacciones/ensayos de amplificación que requieren diversos reactivos, composiciones, tampones, aditivos y similares. Las mezclas de reacción pueden prepararse al menos parcialmente de forma separada de una plataforma de ensayo o chip/dispositivo de microfluidos, o dentro de sitios de reacción dentro del propio dispositivo (por ejemplo, rociado). Ciertas mezclas de reacción o composiciones pueden prepararse e incluirse como parte de un kit o sistema. Por ejemplo, un sistema puede incluir una composición/mezcla de preamplificación, una composición de ensayo de amplificación, y un dispositivo de microfluidos para realizar la amplificación y los ensayos de detección del número de copias. Dos o más componentes del sistema pueden ensamblarse y proporcionarse como parte de un kit o sistema.

Las reacciones realizadas con los dispositivos de microfluidos descritos en la presente pueden llevarse a cabo con diversos reactivos, tampones, composiciones, aditivos y similares, que pueden formularse para realizar reacciones de la presente invención (por ejemplo, preamplificación, amplificación cuantitativa, etc.). Así, por ejemplo, en el caso de dispositivos en los que los reactivos se depositan, estos pueden rociarse con uno o más reactantes en el sitio de reacción, por ejemplo. En otras realizaciones, por ejemplo, cuando no se produce el rociado sobre el chip, los reactivos pueden proporcionarse en mezclas o volúmenes de reactivos separados del chip u otros componentes del sistema. Un conjunto de aditivos son los reactivos de bloqueo que bloquean los sitios de unión a proteínas sobre el sustrato elastomérico. Puede utilizarse una amplia diversidad de dichos compuestos, incluyendo una serie de diferentes proteínas (por ejemplo, gelatina y diversas proteínas de albúmina, tales como albúmina de suero bovino) y glicerol. También puede resultar útil un aditivo detergente. Puede utilizarse cualquiera de una serie de detergentes diferentes. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a SDS y los diversos detergentes Triton.

En el caso específico de las reacciones de amplificación de ácidos nucleicos, puede incluirse una serie de tipos diferentes de reactivos y/o aditivos. Una categoría son los potenciadores que estimulan la reacción de amplificación. Estos aditivos incluyen, pero no se limitan a reactivos que reducen la estructura secundaria en el ácido nucleico (por ejemplo, betaína), y agentes que reducen los acontecimientos de cebado erróneo (por ejemplo, cloruro de tetrametilamonio).

En general, el cálculo de las CNV se basa en el "número de copias relativo", de modo que las diferencias aparentes

en el número de copias de genes en diferentes muestras no se ven distorsionadas por las diferencias en las cantidades de muestra. El número de copias relativo de un gen (por genoma) puede expresarse como la proporción del número de copias de un gen diana al número de copias de un gen de referencia de una sola copia en una muestra de ADN, que generalmente es 1. Utilizando dos ensayos para los dos genes (la secuencia polinucleotídica diana y la secuencia polinucleotídica de referencia) con dos tintes fluorescentes diferentes sobre el mismo dispositivo, ambos genes en la misma muestra de ADN pueden cuantificarse de modo simultáneo. Por consiguiente, la proporción de los dos genes es el número de copias relativo de la secuencia nucleotídica diana en una muestra de ADN.

En una realización de la presente invención, la preamplificación puede realizarse utilizando un gen de referencia, tal como una ARNasa P, que es un gen de una sola copia que codifica el resto de ARN para la enzima ARNasa P, una ribonucleoproteína.

El desarrollo de un gran número de muestras replicadas puede requerir cantidades significativas de reactivos. En una realización de la presente invención se realiza una PCR digital en microvolúmenes. Las cámaras de reacción para realizar una PCR de volumen pequeño pueden ser de aproximadamente 2 nl a aproximadamente 500 nl. Cuanto más pequeño sea el volumen de la cámara de reacción, mayor será el número de ensayos individuales que se puedan hacer (utilizando diferentes conjuntos de sondas y cebadores, o como replicados de los mismos conjuntos de sondas y cebadores, o cualquier combinación de una serie de replicados y de una serie de ensayos diferentes). En una realización, la cámara de reacción es de aproximadamente 2 nl a aproximadamente 50 nl, preferiblemente de 2 nl a aproximadamente 25 nl, más preferiblemente de aproximadamente 4 nl a aproximadamente 15 nl. En algunas realizaciones, el volumen de la cámara de reacción es de aproximadamente 4 nl, aproximadamente 5 nl, aproximadamente 6 nl, aproximadamente 7 nl, aproximadamente 8 nl, aproximadamente 9 nl, aproximadamente 10 nl, aproximadamente 11 nl, o aproximadamente 12 nl. Las cámaras de las muestras pueden fabricarse de vidrio, plástico, silicona, polímeros elastoméricos tales como polidimetilsiloxano, poliuretano u otros polímeros. Las muestras procesadas mediante el método de la presente invención son adecuadas para su uso en un análisis del número de copias variable empleando el sistema BioMark™ (Fluidigm Corporation, South San Francisco, CA). El sistema BioMark™ utiliza un dispositivo de microfluidos de polidimetilsiloxano que proporciona la ejecución de múltiples ensayos sobre múltiples muestras.

Los chips/dispositivos de nanofluidos Fluidigm (matrices digitales) y el sistema de termociclado de formación de imágenes de fluorescencia BioMark están fabricados por Fluidigm Corporation (South San Francisco, CA). Un ejemplo de chip según se ilustra en la figura 5 tiene 12 paneles, y cada uno de los 12 paneles contiene 765 cámaras de 6 nl con un volumen total de 4,59 µl por panel. Los chips se fabrican siguiendo la metodología de la litografía blanda de múltiples capas (MSL) (Unger, M.A., Chou, H.P., Thorsen, T., Scherer, A., Quake, S.R., Monolithic microfabricated valves and pumps by multilayer soft lithography, Science, 2000, 288:113-116). El chip tiene canales de muestras que tienen una profundidad semi-elíptica media de 10 µm, una anchura de 70 µm, con un espaciamiento paralelo de 200 µm sobre el centro. Los microfluidos de muestras están fabricados mediante un proceso de molde de dos capas para crear cámaras de división de 265 µm (profundidad) x 150 µm x 150 µm dispuestas a lo largo de cada canal de muestras. En una capa de silicona separada, los canales de control del chip tienen un recorrido perpendicular a los canales de muestras. Las intersecciones de los canales forman válvulas deflectoras para dirigir a los fluidos. Tras la presurización de los canales de control, una membrana fina entre las capas cierra los canales de muestras para aislar cámaras de división individuales. Los canales de control tienen una profundidad de 15 µm, una anchura de 50 µm con un espaciamiento paralelo de 300 µm sobre el centro. La porción externa del dispositivo tiene la misma huella que una microplaca de 384 pocillos convencional, y permite un funcionamiento de válvulas autónomo. Existen 12 puertos de entrada que se corresponden con 12 entradas de muestra separadas al chip. Los chips utilizados pueden incorporar 765 cámaras de división de 6 nl por entrada de muestra, para un total de hasta 14.400 cámaras por chip. En esta realización particular, los canales de muestras discurren de izquierda a derecha conectando las cámaras de reacción individuales, y los canales de control discurren de arriba abajo en la capa inferior. Tras la presurización de los canales de control, una membrana fina entre las capas cierra los canales de muestras para aislar cámaras de división individuales. Las válvulas dividen las cámaras individuales que se mantienen cerradas durante el experimento de PCR.

Para realizar reacciones de PCR a tiempo real, una mezcla de amplificación maestra (por ejemplo, "mezcla maestra") se combina con la muestra que incluye el producto del ensayo de preamplificación. Las mezclas maestras contienen un tampón apropiado, una fuente de iones magnesio (Mg²⁺) en el intervalo de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 mM, preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 2 a aproximadamente 8 mM, nucleótidos y, opcionalmente, detergentes, y estabilizantes. Un ejemplo de un tampón adecuado es el tampón TRIS a una concentración de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 85 mM, siendo preferida una concentración de 10 mM a 30 mM. En una realización, la concentración del tampón TRIS es 20 mM en la forma de mezcla de reacción de doble potencia (2x). La mezcla de reacción puede tener un intervalo de pH de aproximadamente 7,5 a aproximadamente 9,0, siendo típico un intervalo de pH de aproximadamente 8,0 a aproximadamente 8,5. La concentración de nucleótidos puede estar en el intervalo de aproximadamente 25 mM a aproximadamente 1000 mM, generalmente en el intervalo de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 800 mM. Los ejemplos de concentraciones de dNTP son 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 y 800 mM. También pueden incluirse en la mezcla de reacción detergentes, tales como Tween™ 20, Triton® X 100, y Nonidet™ P40. También pueden incluirse agentes

estabilizantes, tales como ditioneitol (DTT, reactivo de Cleland) o mercaptoetanol.

Además, las mezclas maestras pueden contener opcionalmente dUTP, así como uracil ADN glicosilasa (uracil-N-glicosilasa, UNG). UNO es el producto del gen *ung* de *Escherichia coli*, y se ha clonado, secuenciado y expresado en *E. coli*. La uracil-ADN-N-glicosilasa (UNG) elimina los restos uracilo del ADN (monocatenario y bicatenario) sin destruir el esqueleto de azúcar-fosfodiéster del ADN y, así, evita su uso como diana de hibridación o como molde para ADN polimerasas. Los sitios abásicos resultantes son susceptibles de una ruptura hidrolítica a temperaturas elevadas. Así, la eliminación de bases de uracilo normalmente viene acompañada de la fragmentación de ADN (Duncan, B.K., y Chambers, J.A. (1984), *GENE*, 28, 211; Varshney, U., Hutcheon, T., y van de Sande, J.H. (1988), *J. Biol. Chem.*, 263, 7776). Una mezcla maestra está disponible en el mercado en Applied Biosystems, Foster City, CA (TaqMan® Universal Master Mix, nº de catálogo 4304437, 4318157 y 4326708). El uso de UNG se limita generalmente al ensayo de PCR digital y no se emplea en el ensayo de preamplificación.

Para aplicaciones en forma múltiplex se emplean diferentes tintes indicadores fluorescentes para marcar cebadores o sondas distintos para la cuantificación de genes diferentes. Para los estudios de expresión relativa utilizando PCR en forma múltiplex, la cantidad de cebador para el gen de referencia (por ejemplo, β -actina o GAPDH) debe limitarse para evitar la competición entre la amplificación del gen de referencia y del gen de muestra. En general, la concentración final del cebador del gen de referencia debe estar entre 25 y 100 nM. Una titulación del cebador puede resultar útil para la optimización.

Ejemplo

En un ejemplo de una realización de la presente invención, el número de copias de CYP2D6 se determinó con y sin preamplificación. Utilizando una preamplificación según la presente invención, se descubrió que el CYP2D6 en una muestra tenía una duplicación (el número de copias es 3), mientras que con el método de la técnica anterior sin preamplificación, la misma muestra mostró un número de copias de 2.

La mezcla maestra de PCR útil para realizar ensayos de PCR con muestras preparadas mediante el método de la invención puede prepararse con la siguiente composición: Tris 20 mM, pH 8,0, KCl 100 mM, glicerol al 1%, Tween™ al 0,04%, MgCl₂ 5 mM, dNTP 400 mM, enzima AmpliTaq® Gold 0,08 U/ μ l (Applied Biosystems, Foster City, CA). La AmpliTaq ADN polimerasa es la forma recombinante de la Taq ADN polimerasa. Se obtiene mediante la expresión de la Taq ADN polimerasa en un hospedante *E. coli*. Al igual que la Taq ADN polimerasa nativa, carece de actividad endonucleasa y 3'-5' exonucleasa, pero tiene actividad 5'-3' exonucleasa.

En un ejemplo, la preamplificación se realizó en el sistema de PCR GeneAmp 9700 (Applied Biosystems, CA) en una reacción de 5 μ l que contenía 1 x mezcla maestra PreAmp (Applied Biosystems, CA), cebadores 225 nM (ARNasa P como polinucleótido de referencia, y la secuencia diana de interés), y 1 μ l de muestra de ADN. Las condiciones de termociclado fueron 95 °C, 10 minutos de inicio en caliente, y 100 ciclos de 95 °C durante 15 segundos y 60 °C durante 1 minuto. Se añaden 20 μ l de agua a cada reacción después de la preamplificación, y las muestras se analizaron en la matriz digital.

Se analizaron cinco muestras de ADN de Coriell en los chips digitales. Se contó el número de moléculas de CYP2D6 y ARNasa P en el mismo volumen (4,59 μ l) de cada muestra utilizando el programa informático de análisis de PCR digital BioMark empleando la corrección de Poisson, así como el algoritmo de Simant (véase Dube *et al.*, *supra*). Un mapa térmico representativo se muestra en la ilustración simplificada en blanco y negro en la figura 5. Aunque se muestra como acontecimientos en blanco, negro y gris como ilustración, los acontecimientos pueden registrarse y mostrarse de manera gráfica en forma de colores, tales como amarillo, verde o rojo, que corresponden con un gen ARNasa P (VIC, amarillo), un gen CYP2D6 (FAM, rojo), y sin gen, respectivamente. Se ensayaron controles sin molde ("no template control", NTC) en los paneles 1 y 12.

Las proporciones del número de moléculas del gen CYP2D6 al gen ARNasa P se obtuvieron para las cinco muestras. Dos de las proporciones fueron de aproximadamente 0,5, lo cual significa que existe sólo una copia del gen CYP2D6 en cada célula de estas dos muestras (el gen ARNasa P es un gen de una sola copia y siempre hay dos copias del gen en cada célula). Por tanto, los individuos de los que se recogen las muestras de ADN deben tener una delección del gen CYP2D6 sobre un cromosoma. Las otras tres muestras mostraban una proporción de aproximadamente 1, pero esto no excluye la posibilidad de una duplicación, puesto que dos copias estrechamente vinculadas podrían estar sobre una molécula y no se pueden separar. Se realizó una reacción de preamplificación sobre estas cinco muestras y los productos preamplificados se analizaron en el chip digital (tabla 2).

Tabla 2. Uso de la preamplificación para distinguir la duplicación cromosómica de genes

MUESTRAS	PCR DIGITAL CYP2D6/ARNasa P	PREAMPLIFICACIÓN-PCR DIGITAL CYP2D6/ARNasa P	Copias de CYP2D6
NA12155	0,49	0,52	1
NA12872	0,97	0,87	2
NA07357	0,85	0,98	2
NA12873	0,49	0,52	1
NA11994	1,06*	1,49*	3
*La muestra NA11994 tiene una duplicación del gen CYP2D6 sobre un cromosoma.			

Tal como se ilustra en la tabla 2, dos muestras con una proporción de CYP2D6 a ARNasa P de aproximadamente 0,5 cuando se utiliza ADN genómico seguían mostrando una proporción de aproximadamente 0,5 cuando se empleó el proceso de preamplificación de la invención. Una proporción de 0,5 indica una delección. Dos muestras con una proporción de aproximadamente 1 cuando se utiliza ADN genómico también tenían una proporción de aproximadamente 1 con los productos de la preamplificación, lo cual indica un estado alélico normal. Pero una muestra con una proporción de aproximadamente 1 cuando se analiza ADN genómico mostraba una proporción de 1,5 cuando se empleó el proceso de preamplificación. Esto indica que la muestra tiene una duplicación del gen CYP2D2.

10 Detección de la pérdida de heterocigosidad

Una aplicación útil de los métodos descritos para determinar la variación en el número de copias de un gen de interés concreto incluye detectar la pérdida de heterocigosidad ("loss of heterozygosity", LOH). Las técnicas descritas en la presente pueden ofrecer un nuevo nivel de sensibilidad y flexibilidad para detectar la pérdida de heterocigosidad. Los ejemplos de aplicaciones incluyen la detección y/o el estudio de un número anómalo de copias del cromosoma X, o aneuploidía. La pérdida de heterocigosidad (LOH) se refiere a un cambio desde un estado heterocigótico en un genoma normal a un estado homocigótico en un genoma tumoral apareado. Las investigaciones demuestran que la pérdida de un cromosoma X completo está implicada en numerosos cánceres (Moertel, C.A. *et al.*, *Cancer Genet. Cytogenet.*, 67:21-27 (1993)). Por ejemplo, 40% de los cánceres de ovario están asociados con LOH en regiones del cromosoma X (Osbourne, R.J. y Leech, V., *Br. J. Cancer*, 69:429-438 (1994)). Además, se ha demostrado que la ganancia de un cromosoma X es relativamente común en leucemias y linfomas (Sandberg, A.A., "The X chromosome in human neoplasia, including sex chromatin and congenital conditions with X-chromosome anomalies", en Sandberg, A.A., editor, *Cytogenetics of the mammalian X chromosome*, parte B: X chromosome anomalies and their clinical manifestations, Nueva York, Alan R. Liss, 459-498 (1983)).

Para realizar los experimentos de LOH, pueden proporcionarse dispositivos de microfluidos según se describen en la presente. La figura 3 muestra la arquitectura de un ejemplo de un dispositivo que se empleó para determinar la pérdida de heterocigosidad en un ejemplo (véase, por ejemplo, el anterior análisis para más detalles del dispositivo). Brevemente, el dispositivo incluye un circuito de microfluidos integrado (IFC) que tiene 12 paneles, cada uno con una entrada de flujo para una muestra o mezcla de ensayo. En un ejemplo, la muestra se traslada al chip para su carga, y se carga colocando la matriz digital sobre el controlador de IFC y empleando la interfase del programa informático para cargar con presión los componentes del ensayo hacia los diferentes paneles de 765 reacciones. Cada una de las doce muestras, que se premezclaron con la mezcla maestra y conjuntos de cebador-sonda, se distribuyó en entradas separadas en el marco del chip. Dentro de cada panel, una única muestra se repartió en 765 reacciones individuales de PCR a tiempo real de 6 nl. Se realizó una PCR con la muestra. La matriz digital se colocó en un sistema de PCR a tiempo real para el termociclado y la detección de fluorescencia. Los resultados del experimento se visualizaron y se analizaron utilizando la aplicación del programa informático BioMark®. Se registraron las curvas de la PCR a tiempo real o las imágenes de consumación de las cámaras positivas para comparar un ensayo frente a otro ensayo, por ejemplo, se calculó la proporción de dos secuencias cualesquiera en una muestra de ADN. Para el análisis, las matrices digitales muestran una mejor linealidad, sensibilidad, y facilidad de uso.

En el ejemplo descrito, se obtuvo ADN de líneas celulares que contenían 1, 2, 3, 4 o 5 copias del cromosoma X (Coriell Institute for Medical Research, Camden, NJ). Se emplearon matrices digitales para ensayar cada muestra frente a tres conjuntos distintos de cebador-sonda TaqMan® de cromosoma X (123B, SMS e YY2 marcados con FAM [BioSearch Technologies, Novato, CA]) que se coamplificaron en presencia de una secuencia "de referencia" marcada con VIC dirigida a una sola copia.

La figura 6 muestra un diagrama en blanco y negro que ilustra los resultados a color que estudian la pérdida de heterocigosidad según se describe, y también ilustra cada ejecución del ensayo en paneles duplicados dentro de las

matrices digitales. La figura 6 también muestra una vista aumentada del panel 4 del dispositivo. En cada panel, se contó el número de cámaras positivas a la diana (gris claro, que se corresponde con un color, por ejemplo, amarillo) y positivas a la referencia (gris más oscuro, que se corresponde con un segundo color, por ejemplo, rojo) y se corrigió para múltiples tintes por cámara. A partir de estos resultados, se determinó la proporción bruta de diana a referencia. Se emplearon controles sin molde (NTC) en los paneles 1 y 12. Se apreciará que, en experimentos prácticos, se pueden registrar diferentes colores y los resultados ilustrarse a color, tales como rojo y amarillo, que se indican en la figura 6 como grises en la ilustración en blanco y negro.

Se empleó un ajuste lineal simple para determinar el número de copias. La figura 7 muestra la media de las proporciones de tres ensayos diferentes (eje de ordenadas) representada gráficamente frente al número de copias conocido del cromosoma X (eje de abscisas), incluyendo barras de error que muestran el error estándar de la media. Las proporciones producen pendientes para muestras de ADN que se sabe que contienen 1, 2, 3, 4 o 5 copias del cromosoma X. Las mediciones brutas de las proporciones individuales se multiplicaron por 2 y se promediaron para obtener el número de copias por genoma diploide. La respuesta media para todos los ensayos, de 1 a 5 variantes de número de copias, es un valor r^2 de 0,994, lo cual indica una actuación del ensayo muy lineal.

La tabla 3 lista las proporciones brutas de los conjuntos de sondas-cebadores de TaqMan® para ensayos del cromosoma X individuales ejecutados en los dispositivos de microfluidos. Se determinó la media de copias del cromosoma X por genoma multiplicando la proporción media por 2. La última columna de la derecha muestra el error estándar de la media (EEM). Tal como se muestra en la tabla 3, la media de copias por genoma se corresponde bien con el número de copias conocido del cromosoma X de una muestra.

Tabla 3. Proporciones brutas para ensayos del cromosoma X individuales

Nº de copias conocido del crom. X	Proporción de FAM123 bruta	Proporción de SMS bruta	Proporción de YY2 bruta	Media de copias por genoma	EEM
1x crom.	0,51	0,49	0,61	1,0	0,07
2x crom.	0,77	1,15	0,96	1,9	0,22
3x crom.	1,10	1,19	1,86	2,8	0,48
4x crom.	1,63	2,05	1,79	3,6	0,24
5x crom.	2,03	2,34	2,90	4,8	0,51

Estos resultados indican que los métodos y los dispositivos descritos en la presente permiten la detección y la distinción de diferencias pequeñas, aunque biológicamente importantes, en el número de copias de genes dentro de muestras de ADN genómico muy complejas. Las muestras seleccionadas para estos ensayos son similares o idénticas a las estudiadas en ensayos de CGH y en estudios de micromatrices basados en MIP, según se describe en Visakorpi *et al.*, 1994, *Am. J. Pathol.*, 145:624-630, y Pinkel *et al.*, 1998, *Nat. Genet.*, 20:207-211. Los presentes resultados utilizando los métodos descritos en la presente con matrices digitales pueden producir unos cálculos de número de copias al menos tan discriminantes como los métodos de CGH y MIP conocidos, mientras que reducen la manipulación manual de los técnicos y, por tanto, requieren menos mano de obra y tienen una mayor eficacia. Además, la capacidad para ejecutar múltiples ensayos TaqMan® en un formato de PCR digital proporciona robustez biológica y redundancia del ensayo, compensando las diferencias en la amplificación entre ensayos. Si se fijan como objetivo múltiples loci simultáneamente, los resultados globales de los ensayos son válidos incluso si existen mutaciones o deleciones individuales en sitios de unión al cebador-sonda localizados. Además, la eficacia puede potenciarse utilizando una etapa de preamplificación antes de trasladar la muestra a los dispositivos de microfluidos para el análisis.

REIVINDICACIONES

1.- Un método para determinar el número de copias relativo de una secuencia polinucleotídica diana en el genoma de un sujeto, que comprende:

5 preamplificar una secuencia polinucleotídica diana y una secuencia polinucleotídica de referencia en una muestra que contiene ADN genómico del sujeto;

ensayar la secuencia polinucleotídica diana y la secuencia polinucleotídica de referencia de la muestra preamplificada mediante una PCR digital;

10 determinar (a) el número de moléculas polinucleotídicas amplificadas que contienen la secuencia polinucleotídica diana, y (b) el número de moléculas polinucleotídicas amplificadas que contienen la secuencia polinucleotídica de referencia, y determinar la proporción de (a) a (b).

2.- El método de la reivindicación 1, en el que la muestra procede de un ser humano.

3.- El método de la reivindicación 1, en el que: (i) la proporción de (a) a (b) es de aproximadamente 0,5, y existe una delección de la secuencia polinucleotídica diana sobre un cromosoma; o (ii) la proporción de (a) a (b) es de aproximadamente 1,5, y existe una duplicación de la secuencia polinucleotídica diana sobre un cromosoma.

15 4.- El método de la reivindicación 1, en el que:

la secuencia polinucleotídica de referencia tiene un número de copias genómicas predeterminado N;

la determinación del número de moléculas polinucleotídicas amplificadas que contienen la secuencia polinucleotídica diana comprende determinar el número de volúmenes de reacción en los que está presente la secuencia polinucleotídica diana o una subsecuencia de esta (A);

20 la determinación del número de moléculas polinucleotídicas amplificadas que contienen la secuencia polinucleotídica de referencia comprende determinar el número de volúmenes de reacción en los que está presente la secuencia polinucleotídica de referencia o una subsecuencia de esta (B); y

el número de copias relativo del polinucleótido diana en el genoma es aproximadamente igual a $(A)/(B) \times N$.

25 5.- El método de la reivindicación 4, en el que la realización de la preamplificación comprende combinar la muestra con una composición que comprende cebadores específicos para la secuencia polinucleotídica diana y cebadores específicos para la secuencia polinucleotídica de referencia, y realizar una reacción en cadena de polimerasa (PCR) para amplificar de forma separada el polinucleótido diana y el polinucleótido de referencia en una proporción sustancialmente idéntica.

30 6.- El método de la reivindicación 4, en el que los volúmenes de reacción se disponen en un dispositivo de microfluidos, y la preamplificación se realiza en un volumen de reacción separado del dispositivo de microfluidos.

7.- El método de la reivindicación 4, en el que, antes de ensayar la secuencia polinucleotídica diana y la secuencia polinucleotídica de referencia de la muestra preamplificada mediante una PCR digital, toda o una porción de la muestra preamplificada se combina con reactivos seleccionados para la amplificación cuantitativa de la secuencia polinucleotídica diana y la secuencia polinucleotídica de referencia.

35 8.- El método de la reivindicación 5, en el que los cebadores específicos para la secuencia polinucleotídica de referencia utilizados en la etapa de preamplificación también se utilizan en el ensayo de la secuencia polinucleotídica de referencia de la muestra preamplificada mediante PCR digital.

40 9.- El método de la reivindicación 8, en el que los cebadores específicos para la secuencia polinucleotídica diana utilizados en la etapa de preamplificación también se utilizan en el ensayo de la secuencia polinucleotídica diana de la muestra preamplificada mediante PCR digital.

10.- El método de la reivindicación 7, en el que los reactivos comprenden una primera sonda que se hibrida selectivamente con una secuencia polinucleotídica diana, y una segunda sonda que se hibrida selectivamente con una secuencia polinucleotídica de referencia bajo condiciones adecuadas para la amplificación de polinucleótidos.

45 11.- El método de la reivindicación 10, en el que la primera y la segunda sonda comprenden diferentes marcadores detectables, y en el que la unión de la primera o de la segunda sonda o la degradación de la primera o de la segunda sonda tras una polimerización basada en la reacción en cadena de polimerasa (PCR) produce un cambio en la fluorescencia detectable del respectivo marcador detectable.

12.- El método de la reivindicación 1, en el que la secuencia polinucleotídica de referencia comprende una secuencia polinucleotídica que codifica al menos parcialmente una enzima ARNasa P, beta-actina o GAPDH.

50 13.- El método de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2, en el que una proporción de secuencia polinucleotídica

diana a secuencia polinucleotídica de referencia que se desvíe sustancialmente de un valor de 1 indica un número de copias anómalo de la secuencia polinucleotídica diana en el genoma del paciente.

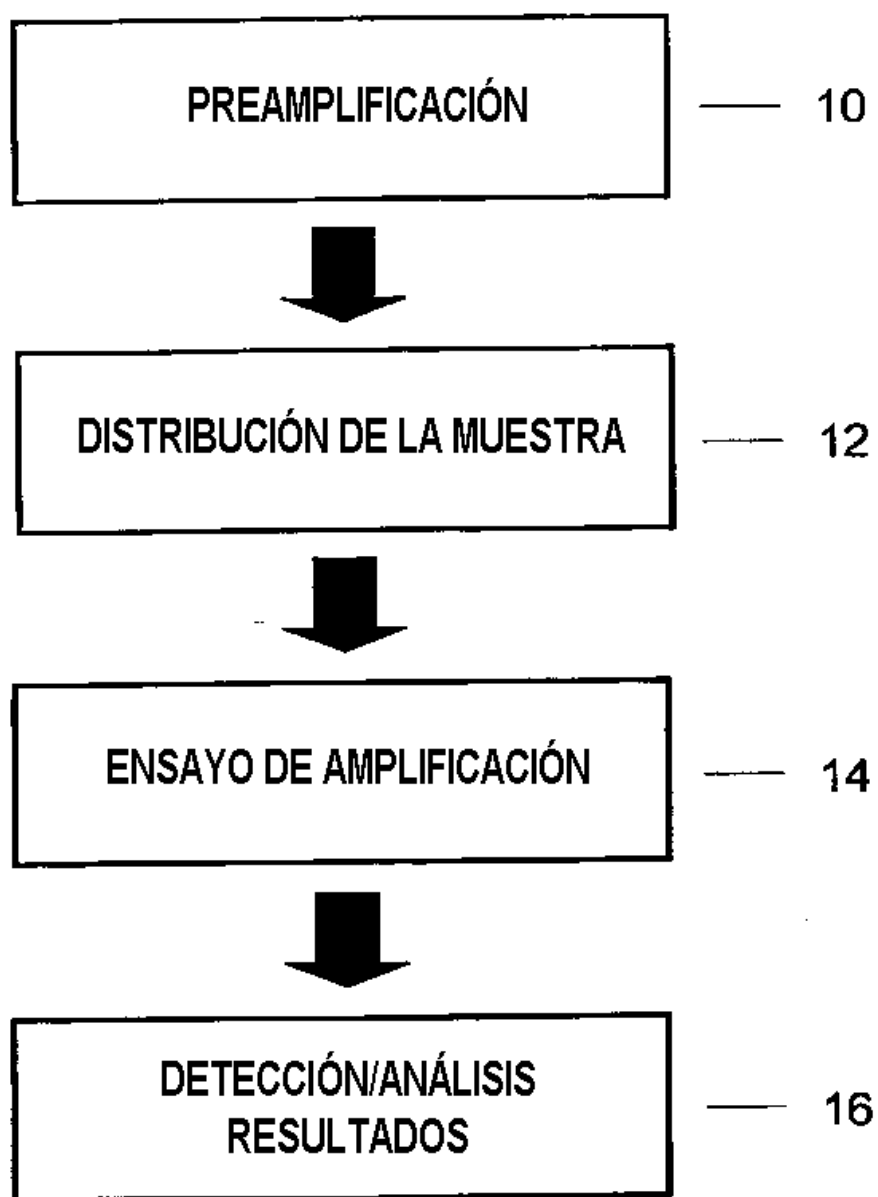


FIG. 1

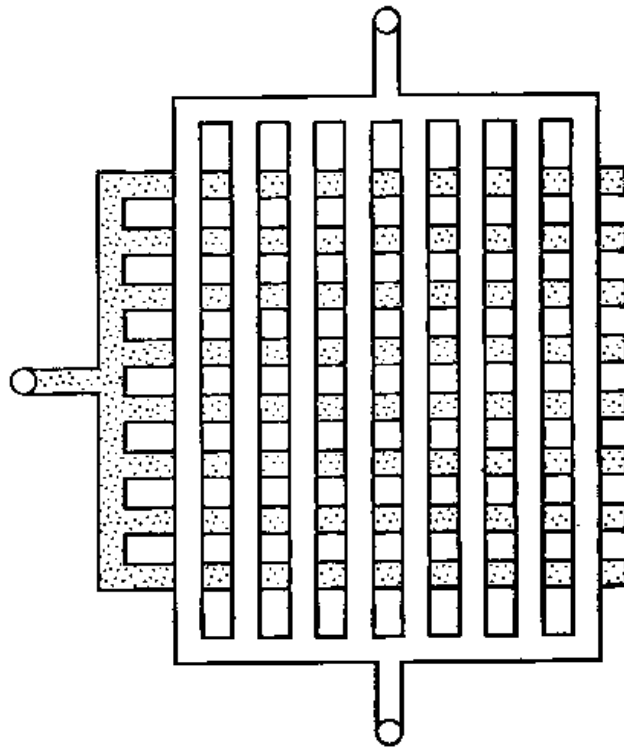


FIG. 2A

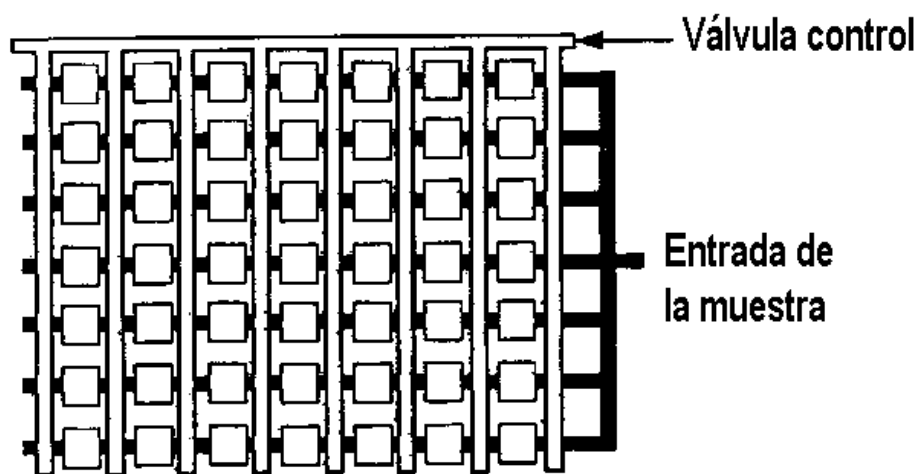
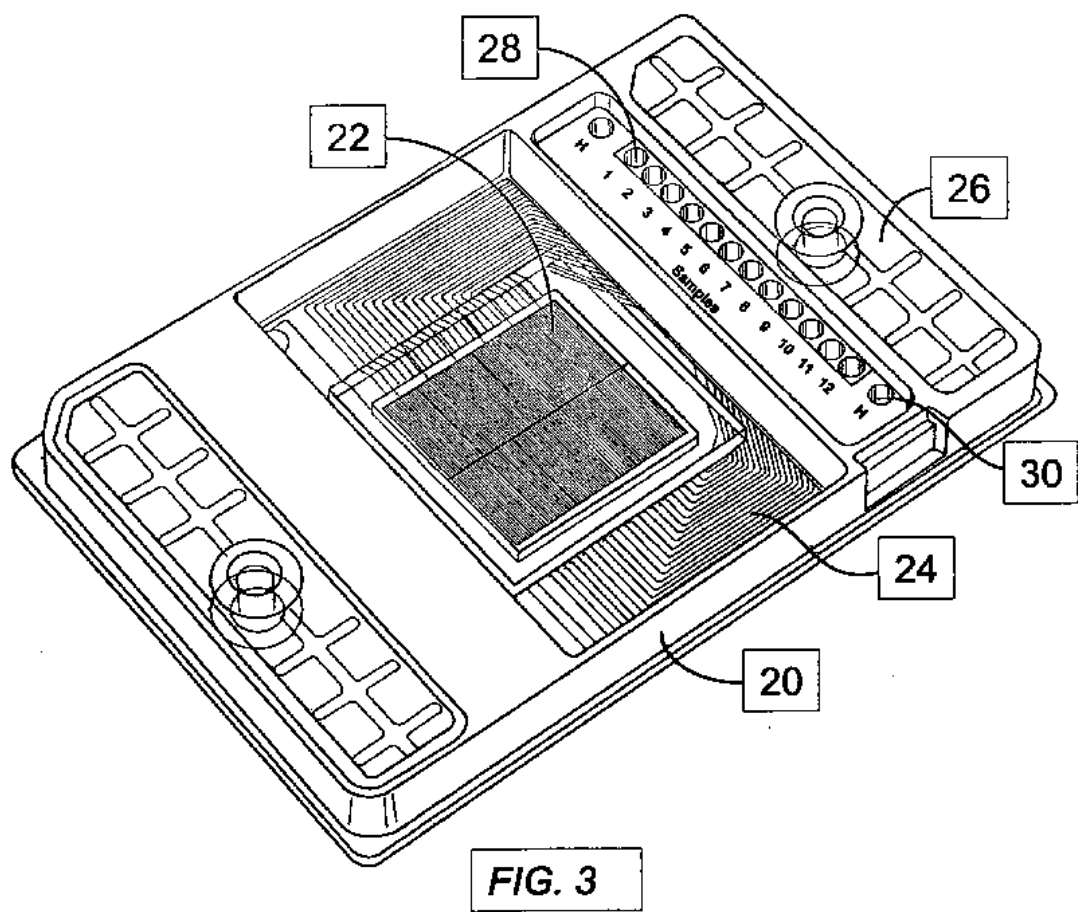


FIG. 2B



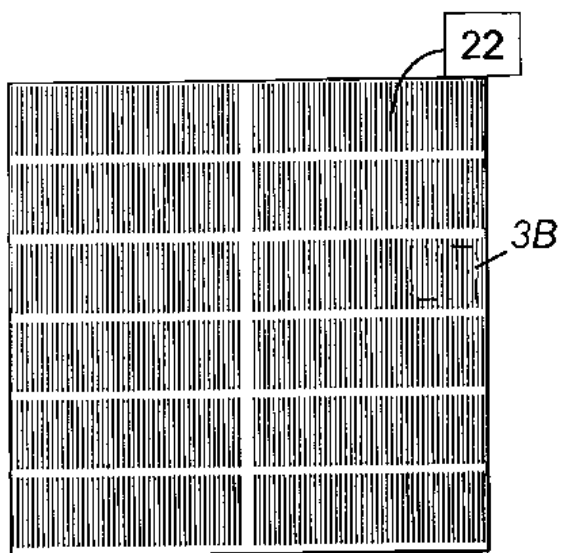


FIG. 4A

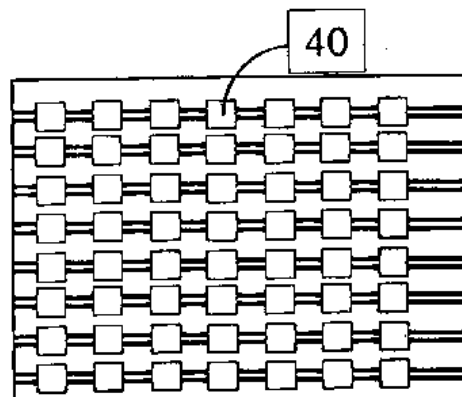


FIG. 4B

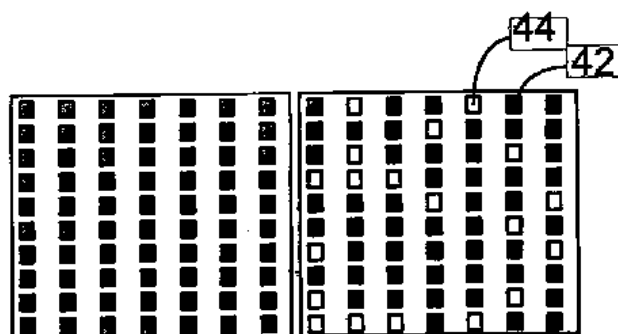


FIG. 4C

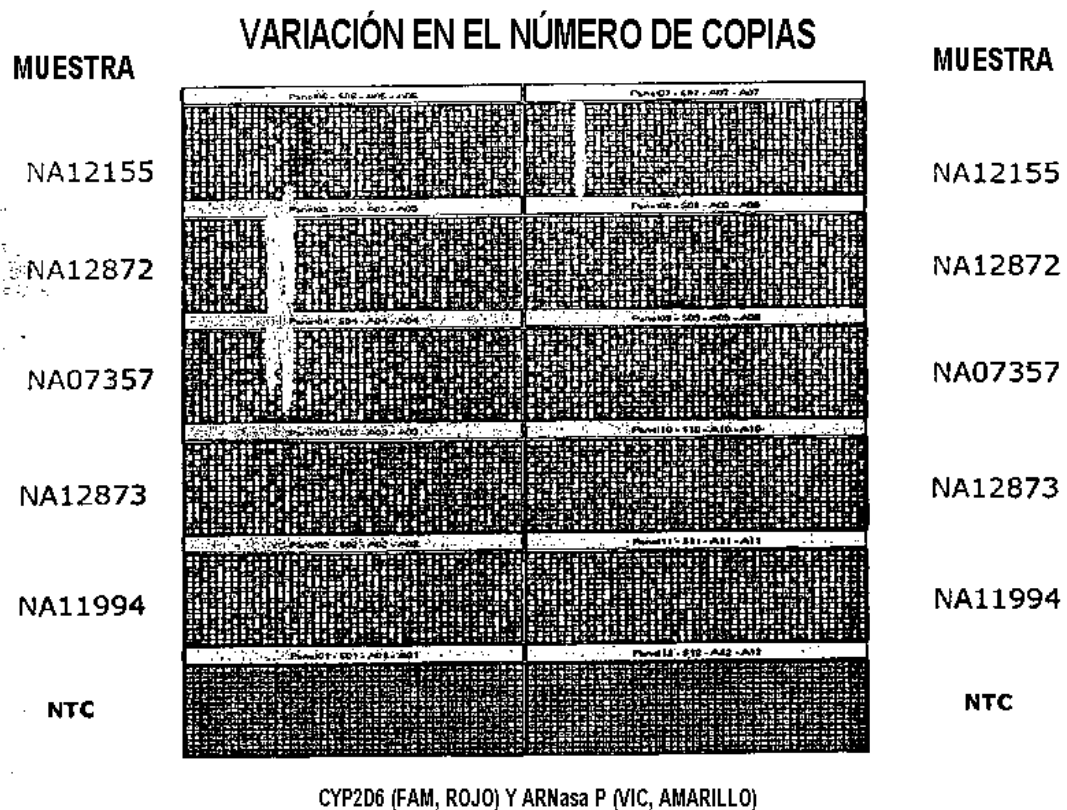


FIG. 5

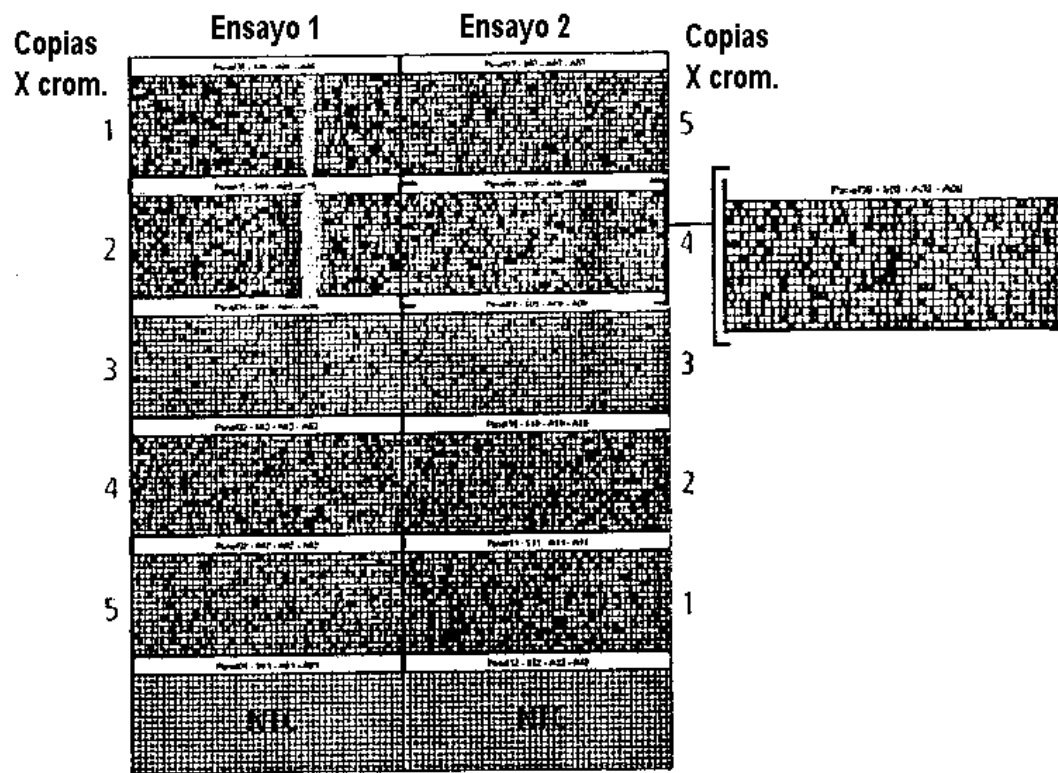


FIG. 6

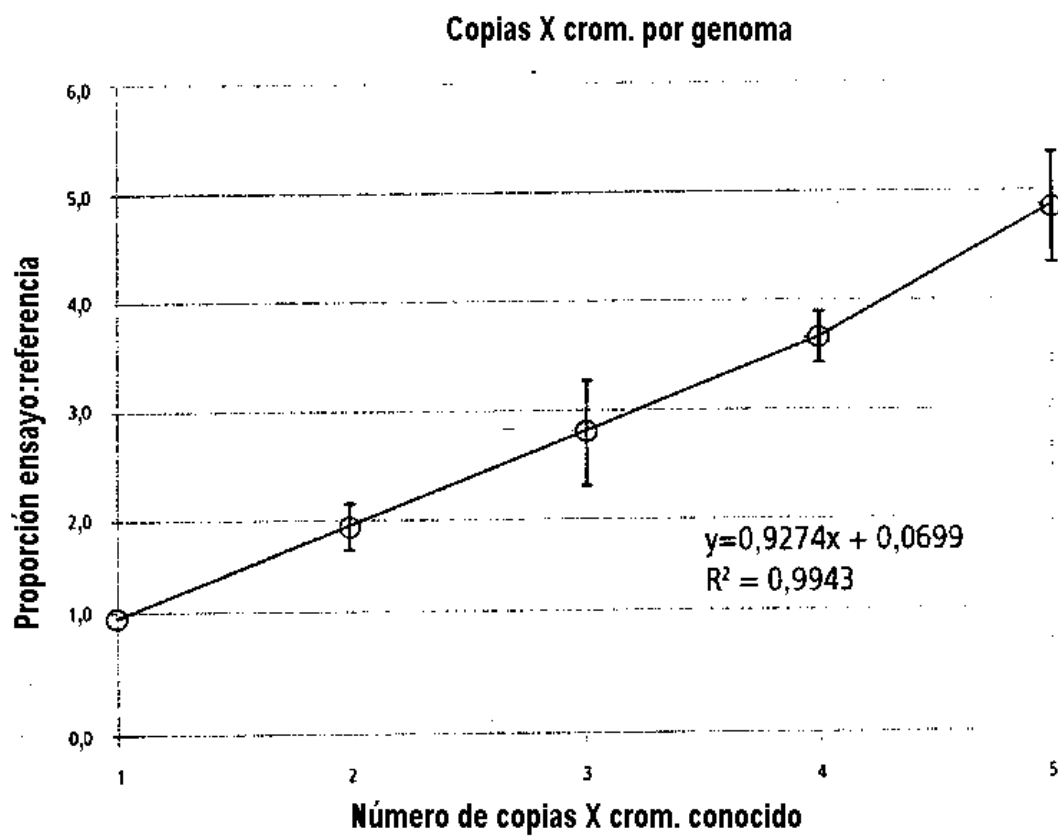


FIG. 7

T	T			T		T	
R	T	R			R		T
	T	R		T	R		T
T		R			T		
				T		T	
T	R		R			R	
	R			T		T	
T			T	T	R		R

FIG. 8