

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 382 475**

51 Int. Cl.:
G01N 35/02 (2006.01)
C12M 1/02 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
G01N 1/36 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05720981 .9**
96 Fecha de presentación: **17.03.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1729136**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **06.12.2006**

54 Título: **Procedimiento de agitación de una solución**

30 Prioridad:
23.03.2004 JP 2004084318

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
08.06.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
08.06.2012

73 Titular/es:
TORAY INDUSTRIES, INC.
1-1, NIHONBASHI-MUROMACHI 2-CHOME CHUO-
KU
TOKYO 103-8666, JP

72 Inventor/es:
TAKII, Yuki;
NAGINO, Kunihisa;
NAKAMURA, Fumio y
NOBUMASA, Hitoshi

74 Agente/Representante:
Durán Moya, Carlos

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 2 382 475 T3

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de agitación de una solución

5 [SECTOR TÉCNICO]

La presente invención se refiere a un procedimiento de agitación de una solución que contiene un analito, en el que una sustancia de enlace selectivo inmovilizada sobre un portador se hace reaccionar con un analito, poniendo en contacto el portador sobre el que se ha inmovilizado, la sustancia que se enlaza selectivamente con el analito (denominada "sustancia de enlace selectivo" en la presente descripción) con una solución que contiene un analito. Más específicamente, la presente invención se refiere a un procedimiento de agitación de una solución que contiene un analito para acelerar la reacción entre una sustancia de enlace selectivo inmovilizada sobre un portador y dicho analito.

15 [TÉCNICA ANTERIOR]

Actualmente se están llevando a cabo investigaciones para analizar la información genética de diversos organismos. Se están determinando con una rapidez considerable un gran número de genes, incluidos los del ser humano, sus secuencias de bases, las proteínas codificadas por dichas secuencias génicas y las cadenas de glúcidos producidas secundariamente a partir de estas proteínas. Las funciones de los genes, proteínas y cadenas de glúcidos de secuencia conocida se pueden estudiar por diversos métodos. Los ácidos nucleicos y su relación con diversos genes y funciones biológicas se pueden estudiar utilizando diversas complementariedades de ácido nucleico/ácido nucleico, por ejemplo, por transferencia Northern o Southern. La función y la expresión de proteínas se pueden estudiar utilizando reacciones proteína/proteína, por ejemplo por transferencia Western.

Recientemente se ha desarrollado un nuevo procedimiento analítico llamado método de micromatrices de ADN (método del chip de ADN) como método para analizar simultáneamente la expresión de múltiples genes, que está despertando mucho interés. En principio, estos métodos son idénticos a los convencionales en el sentido de que son métodos de detección de ácidos nucleicos y de determinación cuantitativa basados en reacciones de hibridación ácido nucleico/ácido nucleico. Estos procedimientos se pueden aplicar a los métodos de detección y determinación cuantitativa de proteínas y cadenas de glúcidos a partir de interacciones específicas proteína/proteína, cadena de glúcido/cadena de glúcido o cadena de glúcido/proteína. Estos métodos se caracterizan por la utilización de un sustrato plano de vidrio llamado "micromatriz" o "chip de ADN" sobre el que se inmovilizan ordenadamente y con una densidad elevada múltiples fragmentos de ADN, proteínas y cadenas de glúcidos. Entre los ejemplos típicos del método del chip de ADN, se incluyen un método en el que se hibrida, por ejemplo, un gen expresado en la célula investigada con una muestra marcada con un colorante fluorescente fijada sobre un sustrato plano, se permite que los ácidos nucleicos complementarios (ADN o ARN) se unan entre sí y se analizan los sitios de reacción con un dispositivo de detección de alta definición (escáner) a alta velocidad, y un método de detección de una respuesta, por ejemplo de la corriente eléctrica, basado en una reacción electroquímica. De este modo, es posible estimar rápidamente la cantidad de un determinado gen presente en la muestra. La aplicación de los chips de ADN no se limita al análisis de la expresión génica para estimar la cantidad de gen expresado, y se han depositado muchas esperanzas de que sirva como medio de detección de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP).

Por ejemplo, se ha desarrollado un procedimiento que consiste en el recubrimiento de un sustrato plano, tal como un vidrio portaobjetos, con poli-L-lisina, aminosilano o similares, y la posterior inmovilización de ácidos nucleicos mediante un dispositivo de fijación llamado "spotter", como método de inmovilización de un ácido nucleico sobre un sustrato (solicitud de patente japonesa publicada 10-503841).

Los ADNc y fragmentos de los mismos que tienen cientos de miles de bases y que se han utilizado tradicionalmente como sonda de ácido nucleico (ácido nucleico inmovilizado sobre un sustrato) para su utilización en chips de ADN están siendo progresivamente reemplazados por secuencias oligonucleotídicas (ADN con un número de bases comprendido entre 10 y 100), ya que las mismas reducen el número de errores durante la hibridación con el analito y se pueden preparar fácilmente en un sintetizador. Las secuencias oligonucleotídicas están unidas covalentemente a la placa de vidrio (solicitud de patente japonesa publicada 2001-108683).

Actualmente, los chips de ADN se utilizan principalmente como herramienta de investigación para analizar un gran número de genes a la vez, disponiendo desde decenas de miles a varios miles de genes en un único chip. Se espera que los chips de ADN se puedan utilizar más ampliamente en aplicaciones de diagnóstico. En general, se prevé que cuando el chip de ADN se utilice en aplicaciones de diagnóstico, la cantidad de muestra recogida será muy pequeña. Los chips de ADN actuales todavía presentan una sensibilidad insuficiente y, por lo tanto, resulta imposible analizar dicha muestra. Además, con los chips de ADN actuales, la intensidad de fluorescencia de los genes con una menor cantidad de expresión después de la hibridación es muy baja y, por lo tanto, dichos chips continúan presentando el problema de que es prácticamente imposible analizar dichos genes. Por consiguiente, los chips de ADN actuales plantean el problema de cómo aumentar la intensidad de fluorescencia después de la hibridación de las muestras de menor cantidad y de los genes con una menor cantidad de expresión. Para resolver este problema, resulta esencial mejorar la eficiencia de la reacción entre el ADN analito y el ADN sonda. Para

acelerar la reacción entre el ADN analito y la sonda, la difusión natural del analito resulta insuficiente, de modo que se ha pensado en acelerar eficazmente la reacción entre la sonda y el analito mediante la agitación de la solución.

Por ejemplo, como procedimiento de agitación de una solución de analito, las solicitudes de patente japonesa publicadas 2003-248008 y 2003-339375 dan a conocer un procedimiento para aumentar la eficacia de la reacción con un analito mediante la agitación de una solución de analito por efecto del movimiento de bolas magnéticas presentes en dicha solución mediante una fuerza magnética. Alternativamente, la solicitud de patente japonesa publicada 2003-339375 da a conocer un procedimiento para aumentar la señal después de la hibridación, poniendo en contacto una solución de analito que contiene bolas con un chip de ADN, sellando dicha solución, por ejemplo, con un vidrio cubreobjetos, y haciendo que las bolas caigan en dirección gravitatoria mientras se hace girar el chip, con lo que se agita la solución de analito. En el documento JP 2003-329679 se da a conocer otro procedimiento de agitación de una solución.

Sin embargo, los procedimientos descritos en la solicitud de patente japonesa publicada 2003-248008 y 2003-339375 siguen presentando los siguientes problemas.

En general, cuando una solución de analito se sella con un vidrio cubreobjetos convencional sobre un chip de ADN en forma de placa plana, la separación entre el vidrio cubreobjetos y el chip de ADN es aproximadamente, como máximo, de 10 μm . Este hecho conlleva el problema de que las partículas finas con un diámetro mayor que dicha separación, cuando se incorporan, quedan fijadas en dicho espacio libre entre el chip de ADN y el cubreobjetos, con lo que el movimiento queda impedido y la agitación resulta ineficaz. Además, la utilización de partículas finas de diversos μm de diámetro presenta el problema de que las partículas finas no se mueven eficazmente en la solución de analito por culpa de la resistencia de la solución aunque se vean forzadas por la gravedad o una fuerza similar, lo que da lugar a una agitación insuficiente. El contacto entre las partículas finas y el portador sobre el que se inmoviliza la sonda de ADN parece ser una razón para dicha característica de agitación insuficiente aunque se fuerce la migración de dichas partículas finas mediante gravedad. Alternativamente, la solución se puede mezclar por agitación de las partículas finas presentes en la solución de reacción, ampliando la separación entre el vidrio cubreobjetos y el chip de ADN, por ejemplo con una junta tórica, aumentando el tamaño de las partículas finas de agitación y forzando su movimiento mediante una fuerza gravitatoria o magnética. Sin embargo, el vidrio cubreobjetos y el chip de ADN tienen ambos una forma plana para el sellado y, por lo tanto, las partículas finas se mueven a través de la zona de la sonda de ADN inmovilizada. Por consiguiente, con frecuencia las partículas finas dañan la zona en la que se inmoviliza el ADN sonda, lo que provoca problemas tales como dificultad de análisis de los datos y disminución de la intensidad de la señal debido a la separación de la sonda por efecto de la colisión de las partículas finas con la superficie donde la misma se ha inmovilizado.

[DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION]

La presente invención da a conocer un procedimiento de agitación de una solución que comprende la puesta en contacto de una sustancia de enlace selectivo inmovilizada sobre la superficie de un portador con una solución que contiene un analito que reacciona con dicha sustancia de enlace selectivo, la incorporación de partículas finas a la solución que contiene el analito y el movimiento de dichas partículas finas sin permitir el contacto de las mismas con la superficie sobre la que se ha inmovilizado la sustancia de enlace selectivo, en el que el portador y/o el recipiente de la solución tienen una estructura tal que las partículas finas no entran en contacto con la superficie sobre la que se ha inmovilizado la sustancia de enlace selectivo y la anchura mínima de las partículas finas es mayor que la distancia mínima entre la superficie sobre la que se ha inmovilizado la sustancia de enlace selectivo y el recipiente de la solución.

[BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS]

La figura 1 es una vista esquemática en sección transversal de una realización de la presente invención.

La figura 2 es una vista esquemática en sección transversal de otra realización de la presente invención.

La figura 3 es una vista esquemática que ilustra un portador.

La figura 4 es una vista esquemática en sección transversal que ilustra un portador.

La figura 5 ilustra un ejemplo de guía de fijación para un chip de ADN.

La figura 6 es un diagrama conceptual de un portador que presenta una capa de soporte y una capa de inmovilización de la sustancia de enlace selectivo.

La figura 7 es un esquema de reacción cuando se inmoviliza una sustancia de enlace selectivo sobre una superficie de PMMA.

La figura 8 es una vista esquemática de la guía utilizada en el ejemplo 9.

La figura 9 ilustra el cambio de intensidad de fluorescencia en función del cambio de concentración diana.

[EXPLICACIÓN DE LAS REFERENCIAS]

- 5 1 Sustancia de enlace selectivo inmovilizada sobre un portador (ADN)
- 2 Partículas finas (bolas)
- 10 3 Portador
- 4 Recipiente de reacción para la solución
- 11 Zona plana
- 15 12 Zona convexo-cóncava
- 13 Chip de ADN
- 20 14 Lente objetivo
- 15 Luz láser de excitación
- 16 Resorte para la fijación de la micromatriz a la guía
- 25 31 Capa de inmovilización de la sustancia de enlace selectivo
- 32 Capa de soporte
- 30 41 PMMA
- 42 ADN
- 51 Imán
- 35 52 Dirección del movimiento de vaivén del imán
- 53 Sustrato

40 [MEJOR MODO DE LLEVAR A CABO LA INVENCION]

A continuación, se describe el procedimiento de agitación de una solución según la presente invención.

45 El primer procedimiento de agitación de una solución según una realización es un procedimiento que comprende poner en contacto una sustancia de enlace selectivo inmovilizada sobre la superficie de un portador con una solución que contiene un analito que reacciona con dicha sustancia de enlace selectivo, incorporar partículas finas a la solución que contiene dicho analito y mover dichas partículas finas sin permitir el contacto de las mismas con la superficie sobre la que se ha inmovilizado la sustancia de enlace selectivo.

50 En el primer procedimiento de agitación de una solución según una realización, la solución se debe agitar mezclando las partículas finas a la solución que contiene un analito y moviendo dichas partículas finas.

Además, en este primer procedimiento de agitación de una solución según una realización, la solución se agita moviendo las partículas finas sin permitir el contacto de las mismas con la superficie sobre la que se ha inmovilizado la sustancia de enlace selectivo. Así, se pueden evitar daños en la superficie provocados por el contacto de las partículas finas con la superficie sobre la que se inmoviliza la sonda, restringiendo la zona de movimiento de dichas partículas finas.

60 Resulta preferente utilizar un portador con una estructura tal que las partículas finas no entren en contacto con la superficie sobre la que se ha inmovilizado la sustancia de enlace selectivo. Preferentemente, el portador presenta una superficie convexo-cóncava y la sustancia de enlace selectivo se inmoviliza sobre la cara superior de las zonas convexas.

65 También resulta preferente utilizar un recipiente para la solución con una estructura tal que las partículas finas no entran en contacto con la superficie sobre la que se ha inmovilizado la sustancia de enlace selectivo.

El segundo procedimiento de agitación de una solución según una realización es un procedimiento de agitación de una solución que comprende poner en contacto una sustancia de enlace selectivo inmovilizada sobre la cara superior de las zonas convexas de un portador con una solución que contiene un analito que reacciona con la sustancia de enlace selectivo, incorporar partículas finas a dicha solución que contiene el analito y mover dichas partículas finas.

Se utilizan partículas finas en el primer y el segundo procedimiento de agitación de una solución según las anteriores realizaciones.

En el procedimiento de agitación de una solución según la presente invención, el tamaño de las partículas finas (diámetro máximo de las mismas) es preferentemente de 10 μm o mayor. Cuando el tamaño de las partículas finas es menor de 10 μm , existe la posibilidad de que no se produzcan muchos de los efectos conseguidos mediante la agitación con partículas finas. Esto es debido a que, cuando el tamaño de las partículas finas es menor de 10 μm , puede ocurrir que dichas partículas finas no puedan apenas moverse, incluso aunque se aplique un campo externo (campo magnético, gravedad o vibración), a causa de la resistencia ejercida por la solución. Particularmente, el tamaño de las partículas finas es preferentemente de 20 μm o mayor.

En el procedimiento de agitación de una solución según la presente invención, se pueden utilizar partículas finas que adoptan cualquier forma. Particularmente, dichas partículas finas son preferentemente esféricas, es decir, en forma de bola. Ventajosamente, cuando las partículas finas tienen forma de bola, se mueven suavemente en la solución de reacción sin quedar bloqueadas gracias a su propia rotación, y en consecuencia permiten una agitación ventajosa de la solución de analito. De la forma más preferente, las partículas finas son partículas finas esféricas (bolas) con un diámetro comprendido entre 20 y 300 μm . Cuando el diámetro de las bolas está comprendido dentro de dicho intervalo, éstas migran fácilmente por gravedad o aceleración en la solución debido a su peso, incluso aunque la solución de reacción ejerza resistencia, con lo que la solución se agita suficientemente y, en consecuencia, la utilización de dichas bolas facilite un resultado ventajoso.

En el procedimiento de agitación de una solución según la presente invención, el material para las partículas finas no está particularmente limitado. Entre los ejemplos de materiales para las partículas finas se incluyen metales, vidrio, cerámicas y polímeros (tal como poliestireno, polipropileno y nailon). Entre éstos, resultan preferentes las bolas de un material con una densidad mayor que la del agua (tal como vidrio, cuarzo o cerámica de circonita), ya que las bolas migran fácilmente en solución ayudadas por la aceleración por gravedad o vibración. Alternativamente, se pueden utilizar también bolas magnéticas. Particularmente, las bolas de cerámica de circonita tienen una densidad más alta y son muy preferentes, ya que migran fácilmente gracias a la aceleración por gravedad o vibración. Alternativamente, también resultan ventajosos el vidrio, el cuarzo y la cerámica de circonita, ya que se disuelven y se liberan en la solución de analito cantidades menores de los componentes de las bolas.

Las bolas de cerámica de circonita (circonita estabilizada con óxido de itrio) son particularmente ventajosas, ya que tienen una densidad de 6 g/cm^3 , mayor que la del vidrio de cuarzo, de 2,2 g/cm^3 , y por lo tanto tienen una mayor eficacia de agitación y son más fáciles de manejar, ya que son resistentes a la perturbación, por ejemplo cuando una solución que las contiene se introduce en un recipiente y se agita para el sellado.

En el procedimiento de agitación de una solución según la presente invención, la solución se agita moviendo las partículas finas. Más preferentemente, en el procedimiento de agitación de una solución según la presente invención, las partículas finas son forzadas a moverse por gravedad, fuerza magnética, vibración del portador o una combinación de los mismos. Entre éstos, resulta preferente un procedimiento que consiste en mover las bolas por gravedad a la vez que se hace girar el portador a lo largo de una cara vertical, ya que dicho procedimiento es más fácil de llevar a cabo y da lugar a un efecto suficientemente ventajoso. En este caso, la velocidad de rotación está preferentemente comprendida entre 0,1 y 30 rpm. Si la velocidad de rotación es mayor de 30 rpm, existe la posibilidad de aplicar gravedad sobre las partículas finas en la dirección opuesta, antes de que se muevan completamente en una dirección. En consecuencia, la distancia del movimiento oscilante de las partículas finas en la solución de analito disminuye y puede ocurrir que no se alcance un efecto de agitación suficiente. Alternativamente, si la velocidad de rotación es menor de 0,1 rpm, existe la posibilidad de que el período total disminuya cuando las partículas finas se mueven en la solución, y en consecuencia puede disminuir el período de agitación de la solución de analito y puede ocurrir que no se alcance un efecto suficiente. Por este motivo, el intervalo preferente de la velocidad de rotación está comprendido entre 0,5 y 5 rpm. En un procedimiento ventajoso, las partículas finas en solución se agitan con una aceleración adicional por vibración horizontal del portador.

En el procedimiento de agitación de una solución según la presente invención, se utiliza un recipiente para la solución. En el procedimiento de agitación de una solución según la presente invención, la solución se agita mediante el movimiento de las partículas finas y la anchura mínima de dichas partículas finas es mayor que la distancia mínima entre la superficie sobre la que se ha inmovilizado la sustancia de enlace selectivo y el recipiente de la solución.

Preferentemente, en el procedimiento de agitación de una solución según la presente invención, la anchura máxima de las partículas finas es de 10 μm o mayor, y es menor que la diferencia de altura entre la cara superior de las zonas convexas y la zona cóncava.

5 Preferentemente, en el procedimiento de agitación de una solución según la presente invención, la solución se agita por el movimiento de las partículas finas y el portador tiene una superficie convexo-cóncava, y la sustancia de enlace selectivo se inmoviliza sobre la cara superior de las zonas convexas y las partículas finas se mueven en la zona cóncava.

10 Preferentemente, en el procedimiento de agitación de una solución según la presente invención, el portador presenta una zona plana y una zona convexo-cóncava, la sustancia de enlace selectivo se inmoviliza sobre la cara superior de las zonas convexas, la altura de la cara superior de las zonas convexas es prácticamente idéntica y la diferencia de altura entre la zona plana y la cara superior de las zonas convexas es de 50 μm o menor.

15 A continuación se describen las formas ventajosas del portador sobre el que se inmoviliza la sustancia de enlace selectivo.

Preferentemente, el portador sobre el que se inmoviliza la sustancia de enlace selectivo para su utilización en el procedimiento de agitación según la presente invención tiene una zona convexo-cóncava y la sustancia compatible selectiva se inmoviliza sobre la cara superior de las zonas convexas. Es posible obtener resultados ventajosos, tales como un bajo nivel de ruido y una relación señal/ruido elevada, mediante la utilización de un portador que presenta dicha estructura, ya que durante la detección no se observa ningún analito adsorbido inespecíficamente en el mismo. Particularmente, la razón de que se produzca un nivel de ruido bajo es la siguiente: cuando se lleva a cabo el barrido de un portador, sobre cuya cara superior de las zonas convexas se ha inmovilizado una sustancia de enlace selectivo, con un dispositivo llamado "escáner", dado que el rayo láser está enfocado sobre la cara superior de las zonas convexas de la zona convexo-cóncava, el mismo está desenfocado en la zona cóncava, lo que impide la fluorescencia no deseada (ruido) del analito adsorbido inespecíficamente sobre la zona cóncava.

En cuanto a la altura de las zonas convexas de la zona convexo-cóncava, sus caras superiores tienen preferentemente una altura prácticamente idéntica. Dicha altura prácticamente idéntica descrita anteriormente se refiere a una altura que no provoca ninguna diferencia significativa en el nivel de intensidad de fluorescencia cuando se hace reaccionar un analito marcado con fluorescencia con una sustancia de enlace selectivo inmovilizada sobre las superficies de las zonas convexas con una altura ligeramente diferente y se analizan con un escáner los analitos enlazados sobre las respectivas superficies. En concreto, dicha altura prácticamente idéntica se refiere a una diferencia en dicha altura de 50 μm o menor. Más preferentemente, la diferencia de altura es de 30 μm o menor; y aún más preferentemente, la altura es idéntica. En la presente solicitud de patente, dicha altura idéntica incluye los errores debidos a las fluctuaciones que pueden tener lugar durante la producción o similares. Si la diferencia de altura entre la cara superior más alta de las zonas convexas y la cara superior más baja de las mismas es mayor de 50 μm , el rayo láser que incide sobre las caras superiores de las zonas convexas con una altura diferente se puede difuminar y, en consecuencia, la intensidad de señal del analito enlazado en la reacción con la sustancia de enlace selectivo inmovilizada sobre la cara superior de las zonas convexas se puede debilitar.

Preferentemente, la cara superior de las zonas convexas es esencialmente plana. El término "esencialmente plana" significa que la cara superior de las zonas convexas no presenta una irregularidad en su altura de 20 μm o mayor.

Preferentemente, el portador destinado a su utilización en el procedimiento de agitación según la presente invención tiene una zona plana. Preferentemente, la altura de las caras superiores de las zonas convexas de la zona convexo-cóncava y la altura de la zona plana son prácticamente idénticas. Es decir, preferentemente, la diferencia de altura entre la zona plana y la cara superior de las zonas convexas es de 50 μm o menor. Si la diferencia de altura entre la cara superior de las zonas convexas y la zona plana es de 50 μm o mayor, la intensidad de fluorescencia detectable se puede debilitar. Más preferentemente, la diferencia de altura entre la zona plana y la cara superior de las zonas convexas es de 30 μm o menor; y de forma más preferente, la altura de la zona plana y la altura de las zonas convexas son idénticas entre sí.

En las figuras 3 y 4 se ilustran ejemplos típicos de los portadores destinados a su utilización en el procedimiento de agitación según la presente invención. En los mismos hay una zona plana indicada mediante el numeral de referencia -11- alrededor de una zona convexo-cóncava, y una sustancia de enlace selectivo (por ejemplo, un ácido nucleico) inmovilizada sobre la cara superior de las zonas convexas, indicadas mediante la referencia -12- en la zona convexo-cóncava. Se puede enfocar fácilmente la luz de excitación del escáner sobre la cara superior utilizando la zona plana. Con frecuencia, para enfocar la luz de excitación de un escáner sobre la superficie del portador, éste se fija a una guía, tal como se muestra en la figura 5, y el punto focal del rayo láser se ajusta previamente a la altura de la superficie de dicho soporte. De este modo, se puede enfocar fácilmente el rayo láser del escáner sobre la cara superior de las zonas convexas del portador presionando la zona plana del portador utilizado en el procedimiento de agitación según la presente invención contra la superficie de la guía.

En el procedimiento de agitación de una solución según la presente invención, las múltiples zonas convexas sobre las que se inmoviliza la sustancia de enlace selectivo en el portador sobre el que se inmoviliza la sustancia de enlace selectivo se refieren a la región sobre la que se inmoviliza una sustancia de enlace selectivo (por ejemplo, un ácido nucleico) esencial para la obtención de datos, excluyéndose la región sobre la que se inmoviliza una sustancia de enlace selectivo no significativa.

En el procedimiento de agitación de una solución según la presente invención, el portador sobre el que se inmoviliza la sustancia de enlace selectivo presenta preferentemente zonas convexas con una superficie prácticamente idéntica en su cara superior. Cuando las superficies de las caras superiores de las zonas convexas son prácticamente idénticas, las múltiples regiones sobre las que se inmoviliza la sustancia de enlace selectivo tienen prácticamente la misma superficie, lo que resulta ventajoso en el análisis posterior. La expresión "preferentemente, las superficies de las respectivas caras superiores de las zonas convexas son prácticamente idénticas" significa que el valor correspondiente a la superficie de la cara superior más grande dividido por la superficie de la cara superior más pequeña de todas las zonas convexas es 1,2 o menor.

En el procedimiento de agitación de una solución según la presente invención, la superficie de la cara superior de las zonas convexas del portador sobre el que se inmoviliza la sustancia de enlace selectivo no está particularmente limitada, pero es preferentemente de 1 mm^2 o menor y de $10 \text{ }\mu\text{m}^2$ o mayor con vistas a la reducción de la cantidad de sustancia de enlace selectivo utilizada y a una mayor facilidad de manejo.

En el procedimiento de agitación de una solución según la presente invención, la altura de las zonas convexas de la zona convexo-cóncava del portador que se utiliza ventajosamente es preferentemente de $10 \text{ }\mu\text{m}$ o mayor y de $500 \text{ }\mu\text{m}$ o menor. Por la razón que se describe a continuación, dicha altura es de forma particularmente preferente de $50 \text{ }\mu\text{m}$ o mayor y de $300 \text{ }\mu\text{m}$ o menor. Si la altura de las zonas convexas es menor que el valor anterior, la muestra de analito adsorbido inespecíficamente en las otras zonas se puede detectar y, por consiguiente, la relación señal/ruido se puede deteriorar. Si la altura de las zonas convexas es de $500 \text{ }\mu\text{m}$ o mayor, puede provocar problemas tales como una mayor facilidad de agrietamiento y rotura de dichas zonas convexas.

En el primer procedimiento de agitación de una solución, el intervalo de movimiento de las partículas finas está restringido. La forma típica del recipiente que contiene el portador y la solución para este fin se describe haciendo referencia a la figura 1.

En la figura 1, el numeral de referencia -1- indica un ADN sonda (sustancia de enlace selectivo). El numeral de referencia -2- indica las partículas finas (en este caso, bolas) y el numeral de referencia -3- indica un portador sobre el que se ha inmovilizado el ADN sonda. Los componentes indicados con los números de referencia -1-, -2- y -3- entran en contacto con una solución que contiene un ADN diana (analito). El numeral de referencia -4- indica un recipiente que contiene líquido, fabricado, por ejemplo, de un material tal como vidrio portaobjetos, vidrio cubreobjetos, metal o plástico, y la solución que contiene el ADN diana queda retenida entre el recipiente y el portador. En el ejemplo de la figura 1, el ADN sonda se inmoviliza sobre las zonas convexas del portador. La distancia mínima entre la cara superior de las zonas convexas del portador (cara sobre la que se inmoviliza la sustancia de enlace selectivo) y el recipiente que contiene la solución es menor que el diámetro de las partículas finas, lo que impide el contacto de las mismas con la cara sobre la que se ha inmovilizado el ADN sonda y se evita así que las partículas finas dañen dicha cara. Si, por ejemplo, las partículas finas tienen una forma elíptica, y si la distancia mínima entre la cara superior de las zonas convexas y el recipiente es menor que la anchura mínima de dichas partículas finas, se puede evitar el contacto de la cara sobre la que se inmoviliza la sonda con las partículas finas.

Una condición para la realización concreta de la situación de la figura 1 consiste en introducir una solución que contiene un ADN analito (solución de analito) gota a gota en un portador que tiene una estructura convexo-cóncava, incorporar partículas finas a dicha solución, impidiendo que se depositen sobre la cara superior de las zonas convexas, cubriéndolas con un vidrio cubreobjetos equivalente al recipiente, y sellar dicho cubreobjetos, por ejemplo, con una cinta adhesiva o un agente para la prevención del derrame o la evaporación de la solución de analito. De este modo, se forma un espacio que contiene la solución de analito con un espesor comprendido entre unos μm y decenas de μm entre la cara del vidrio cubreobjetos y la cara superior de las zonas convexas. Si el tamaño de las partículas finas es mayor que la distancia entre la cara del cubreobjetos y la cara superior de las zonas convexas, las partículas finas no dañan la cara superior de dichas zonas convexas. Se pueden guiar las partículas finas de tal modo que pasen únicamente a través de la zona cóncava de la zona convexo-cóncava y agitar la solución de analito sin que dichas partículas finas entren en contacto con la cara superior de las zonas convexas, por ejemplo utilizando un portador con esta forma y haciéndolo girar en un plano vertical. Preferentemente, para formar el espacio que mantiene fiablemente la solución de analito entre la cara superior de las zonas convexas y el recipiente, se utiliza, por ejemplo, una placa con las esquinas de una cara entre 5 y $100 \text{ }\mu\text{m}$ más altas que la otra cara, o una placa con su zona central rebajada entre 5 y $100 \text{ }\mu\text{m}$, y dicha placa está conectada con el portador sobre el que se inmoviliza la sustancia de enlace selectivo con la zona central de la placa de cara a la zona convexo-cóncava del portador. En la figura 1 (-4-) se ilustra un ejemplo de dicha placa. Dicho recipiente se puede preparar, por ejemplo, tratando vidrio con ácido fluorhídrico, adhiriendo una película o cinta adhesiva en de 2 a 4 esquinas de una placa plana, preparando

una placa con la forma mostrada en la figura 1 (-4-), por ejemplo por moldeo por inyección, o formando puntos elevados en las esquinas de una placa por serigrafía.

En el procedimiento de agitación de una solución, se utiliza un recipiente para la solución con una estructura tal que las partículas finas no entran en contacto con la superficie sobre la que se ha inmovilizado la sustancia de enlace selectivo.

El portador de la figura 1 tiene una forma convexo-cóncava. También se puede obtener un efecto parecido formando una estructura convexo-cóncava en el recipiente para la solución. En la figura 2, se ilustra un ejemplo típico de la misma. En este caso, el ADN sonda se fija debajo de las zonas convexas del recipiente. También en este caso, la distancia entre la cara sobre la que se inmoviliza el ADN sonda y las zonas convexas del recipiente es preferentemente menor que la anchura mínima de las partículas finas. Otro ejemplo típico es uno en el que tanto el portador como el recipiente tienen una estructura convexo-cóncava.

Se pueden obtener los siguientes efectos y, en consecuencia, aumentar la intensidad de la fluorescencia después de la hibridación en mayor medida que en los métodos convencionales, mediante la agitación de una solución de analito que contiene ADN diana con partículas finas a la vez que se utiliza el portador que presenta una zona convexo-cóncava o el recipiente que presenta una zona convexo-cóncava.

Cuando la hibridación se lleva a cabo en combinación con un chip de ADN convencional en forma de placa plana con un vidrio cubreobjetos encima, la distancia entre dicho vidrio cubreobjetos y el chip de ADN es aproximadamente, como máximo, de 10 μm . La utilización de partículas finas con un diámetro mayor da lugar a su obstrucción entre el chip de ADN y el cubreobjetos, lo que provoca problemas tales como la imposibilidad del movimiento de las partículas finas y una disminución de los efectos ventajosos que tiene la incorporación de las mismas. Por otro lado, la utilización de partículas más finas, con un diámetro de varios μm resistente a la obstrucción entre el vidrio cubreobjetos y el chip de ADN, con el fin de prevenir dicha obstrucción y facilitar el movimiento de las partículas finas gracias a la aceleración por gravedad o vibración, sólo da lugar a un movimiento insuficiente de las partículas finas en la solución de analito, ya que la resistencia de la solución se vuelve mayor cuanto menor es el tamaño de dichas partículas finas. En consecuencia, persiste todavía el problema de que no se puede obtener un efecto ventajoso de agitación con partículas finas. Alternativamente, el agrandamiento de la separación entre el vidrio cubreobjetos y el portador, por ejemplo con una junta tórica, y la utilización de partículas finas mayores para conseguir una agitación suficiente, generan el problema de que la intensidad de fluorescencia después de la hibridación se deteriora, presumiblemente porque la superficie del chip sufre daños por parte de las partículas finas y la sonda inmovilizada sobre las superficies se separa debido a la colisión de las partículas finas.

Como en las realizaciones ventajosas de la presente invención, se puede aumentar el tamaño de las partículas finas, como mínimo, hasta la altura entre la zona cóncava y la convexa de la zona convexo-cóncava, tal como se muestra en las figuras 1 y 2, utilizando un portador con una zona convexo-cóncava o un recipiente que presenta una zona convexo-cóncava. De este modo, se pueden obtener efectos ventajosos permitiendo una agitación suficiente de la solución de analito con grandes partículas finas e impidiendo que se produzcan daños en la cara en la que se inmoviliza el ADN sonda mediante la agitación de una solución de analito que contiene un ADN diana con partículas finas con la utilización simultánea de un portador que presenta una zona convexo-cóncava o un recipiente que presenta una zona convexo-cóncava.

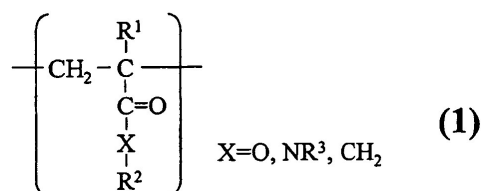
En el procedimiento de agitación de una solución según la presente invención, el material utilizado ventajosamente para el recipiente no está particularmente limitado. Entre los ejemplos de materiales utilizados ventajosamente en la presente invención para el recipiente se incluyen vidrio, plástico y similares. Si el recipiente tiene forma de placa plana, se utiliza ventajosamente una placa de vidrio, tal como un vidrio cubreobjetos o un vidrio portaobjetos, y si el recipiente tiene forma convexo-cóncava, resulta preferente, desde el punto de vista de la productividad, un material plástico tal como polimetacrilato de metilo o policarbonato, que son moldeables por inyección.

El material utilizado en la presente invención para el portador no está particularmente limitado. Entre los materiales ventajosos para el mismo se incluyen el vidrio y diversos polímeros (poliestireno, polimetacrilato de metilo y policarbonato).

Si el material del portador es vidrio, para la inmovilización de una sustancia de enlace selectivo éste se puede tratar con un agente de acoplamiento de silano a fin de generar grupos funcionales en su superficie y la sustancia de enlace selectivo, por ejemplo ADN, se puede inmovilizar sobre el portador mediante dichos grupos funcionales. Se pueden formar grupos amino en la superficie del vidrio mediante la utilización, por ejemplo, de un aminoalquilsilano, así como inmovilizar, por ejemplo, ADN sobre el mismo aprovechando la fuerza electrostática que se establece entre la carga positiva del grupo amino y la carga negativa del ADN.

En la presente invención, resulta ventajosa la utilización de un material sólido que contiene un polímero que presenta una unidad estructural representada por la siguiente fórmula general (1), particularmente en la superficie portadora para la inmovilización de una sustancia de enlace selectivo, ya que la señal después de la hibridación aumenta.

【Fórmula 1】



En la fórmula general (1), R^1 , R^2 y R^3 representan cada uno un grupo alquilo o arilo o un átomo de hidrógeno. El polímero utilizado que tiene una unidad estructural representada por la anterior fórmula general (1) es un homopolímero o un copolímero. Se utiliza, como mínimo, un tipo de monómero como materia prima para dicho polímero, y dicho monómero presenta un doble enlace para la polimerización o un grupo funcional para la policondensación, ya sea una cetona, un ácido carboxílico o un derivado de los mismos. Más preferentemente, el polímero presenta la estructura representada por la fórmula general (1).

Si el polímero que presenta una unidad estructural representada por la siguiente fórmula general (1) es un copolímero, el mismo contiene preferentemente la unidad estructural representada por la siguiente fórmula general (1) en una cantidad del 10% o mayor con respecto a la cantidad total de todos los monómeros. Si el contenido de la unidad estructural representada por la fórmula general (1) es del 10% o mayor, se pueden formar más grupos carboxilo en la superficie e inmovilizar más ácidos nucleicos sonda en las etapas descritas a continuación, con lo que se obtiene una mejora de la relación señal/ruido.

El polímero de la presente invención es un compuesto con un grado de polimerización promedio en número de 50 o mayor. El grado de polimerización promedio en número del polímero está comprendido preferentemente entre 100 y 10.000, de forma particularmente preferente entre 200 o más y 5.000 o menos. El grado de polimerización promedio en número se puede determinar fácilmente midiendo el peso molecular del polímero según un método común por GPC (cromatografía de permeación sobre gel).

En la fórmula general (1), R^1 y R^2 representan cada uno un grupo alquilo o arilo o un átomo de hidrógeno, y pueden ser idénticos o distintos. El grupo alquilo puede ser un grupo de cadena lineal o ramificada, y preferentemente tiene de 1 a 20 átomos de carbono. El grupo arilo tiene preferentemente de 6 a 18 átomos de carbono, más preferentemente de 6 a 12 átomos de carbono. El grupo funcional X se selecciona arbitrariamente entre O, NR^3 y CH_2 . R^3 es un grupo funcional que se define de modo parecido a R^1 y R^2 .

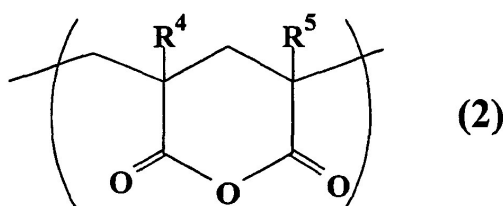
En la presente invención, el polímero de la superficie del portador para la inmovilización de una sustancia de enlace selectivo es preferentemente un polímero que tiene un grupo funcional. Entre los ejemplos ventajosos de los polímeros que tienen un grupo funcional se incluyen metacrilatos de polialquilo (PAMA), tales como metacrilato de polimetilo (PMMA), metacrilato de polietilo (PEMA) y metacrilato de polipropilo, y similares. Entre los anteriores, resulta particularmente preferente el metacrilato de polimetilo. Alternativamente, también se pueden utilizar acetato de polivinilo, metacrilato de policiclohexilo o metacrilato de polifenilo, o similares. Sin embargo, alternativamente, también se puede utilizar un copolímero que combina los componentes poliméricos anteriores o un copolímero que combina los componentes poliméricos y uno o varios otros componentes poliméricos. Entre estos otros polímeros se incluye el poliestireno.

Si el polímero es un copolímero, la proporción de monómero que comprende un grupo carbonilo, por ejemplo metacrilato de alquilo, es preferentemente del 10% en moles o más en todos los componentes. Esto es debido a que de este modo se puede formar un mayor número de grupos carboxilo en la superficie a fin de inmovilizar una mayor cantidad de ácido nucleico sonda y, en consecuencia, mejorar la relación señal/ruido. De la forma más preferente, la proporción de monómero en las unidades estructurales del polímero es del 50% en moles o mayor.

Para la inmovilización de una sustancia de enlace selectivo sobre un portador que contiene un polímero que comprende, como mínimo, una unidad estructural representada por la siguiente fórmula general (1), resulta preferente tratar previamente el portador para formar grupos carboxilo en su superficie. Entre los procedimientos de formación de grupos carboxilo en la superficie del portador se incluyen el tratamiento alcalino o con ácido, el tratamiento con ultrasonidos en agua caliente, la exposición del portador a plasma de oxígeno, plasma de argón o radiación, y similares; sin embargo, la inmersión del portador en una base o un ácido para la generación de grupos carboxilo superficiales resulta preferente a fin de provocar un menor daño en el portador y una mayor productividad. Más específicamente, el portador se puede sumergir en una solución acuosa de hidróxido de sodio o de ácido sulfúrico (concentración preferente: de 1 a 20 N), preferentemente a una temperatura comprendida entre 30°C y 80°C durante un período comprendido entre 1 y 100 horas.

Se puede utilizar como polímero un copolímero termoplástico que contiene una unidad de anhídrido de ácido. Dicho copolímero termoplástico presenta preferentemente una unidad de anhídrido de ácido (i). Dicha unidad de anhídrido de ácido (i) es una unidad presente en los esqueletos de las cadenas principales y laterales o en los extremos terminales de un copolímero termoplástico (A). La estructura de la unidad de anhídrido de ácido (i) no está particularmente limitada y entre los ejemplos de la misma se incluyen una unidad de anhídrido (met)acrílico, una unidad de anhídrido glutárico, una unidad de anhídrido maleico, una unidad de anhídrido itacónico, una unidad de anhídrido citracónico, una unidad de anhídrido aconítico y similares; resultan preferentes las unidades de anhídrido maleico y de anhídrido glutárico; y entre éstas, resulta particularmente preferente una unidad de anhídrido glutárico representada por la siguiente fórmula general (2).

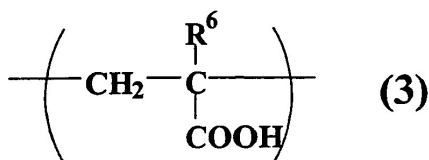
【 Fórmula 2】



(en la fórmula, R⁴ y R⁵ representan cada uno independientemente un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo que tiene de 1 a 5 átomos de carbono).

La estructura del copolímero termoplástico no está particularmente limitada si tiene una unidad de anhídrido de ácido (i), pero el copolímero contiene preferentemente un grupo de ácido carboxílico insaturado (ii) representado por la siguiente fórmula general (3).

【 Fórmula 3】



(en la que R⁶ representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo que tiene de 1 a 5 átomos de carbono)

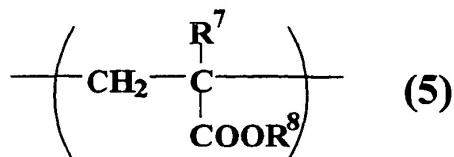
La unidad de ácido carboxílico insaturado (ii) es una unidad obtenida por copolimerización de un monómero de ácido carboxílico insaturado, y el monómero de ácido carboxílico insaturado utilizado en este caso no está particularmente limitado, pudiéndose utilizar cualquier monómero de ácido carboxílico insaturado copolimerizable con otros compuestos vinílicos. Entre los monómeros de ácido carboxílico insaturado favorables se incluyen los compuestos representados por la siguiente fórmula general (4):

【 Fórmula 4】



(en la que R⁶ representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo que tiene de 1 a 5 átomos de carbono), ácido maleico y el hidrolizado de anhídrido maleico, y similares; son preferentes el ácido acrílico y el ácido metacrílico, siendo más preferente el ácido metacrílico desde el punto de vista de la estabilidad térmica. Estos monómeros se pueden utilizar solos o en combinaciones de dos o más. El copolímero termoplástico (A) no está particularmente limitado si contiene una unidad de anhídrido de ácido (i), pero preferentemente contiene una unidad de éster de alquilcarboxilato insaturado (iii) representada por la siguiente fórmula general (5).

【 Fórmula 5】



(en la que R^7 representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo que tiene de 1 a 5 átomos de carbono; R^8 representa un grupo hidrocarburo alifático o alicíclico que tiene de 1 a 6 átomos de carbono, o un grupo hidrocarburo alifático o alicíclico que tiene de 1 a 6 átomos de carbono sustituido, como mínimo, con un grupo hidroxilo o un átomo de halógeno).

La unidad de éster de alquilcarboxilato insaturado (iii) es una unidad obtenida por copolimerización de un monómero de éster de alquilcarboxilato insaturado, y dicho monómero de éster de alquilcarboxilato insaturado no está particularmente limitado, y entre los ejemplos del mismo se incluyen los siguientes compuestos representados por la fórmula general (6):

【 Fórmula 6】



La presencia de los grupos carboxilo y los anhídridos de ácido sobre la superficie del portador permite la inmovilización sobre dicha superficie de una sustancia de enlace selectivo que tiene un grupo amino o un grupo hidroxilo mediante enlaces covalentes. Cuando en la superficie del portador hay grupos carboxilo, se utilizan diversos agentes de condensación, tales como diciclohexilcarbodiimida y N-etil-5-fenilisoxazolio-3'-sulfonato, para acelerar la reacción de estos grupos. Entre dichos agentes, la 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC), que es menos tóxica y se elimina fácilmente del sistema de reacción, es uno de los agentes de condensación más eficaces para la reacción de condensación de una sustancia de enlace selectivo con los grupos carboxilo presentes en la superficie del portador. El agente de condensación, por ejemplo EDC, se puede utilizar incorporándolo a una solución de la sustancia de enlace selectivo, o, alternativamente, se puede sumergir en una solución de EDC un portador que presenta grupos carboxilo formados previamente en su superficie a fin de activar dichos grupos carboxilo superficiales. La utilización de dicho agente de condensación mediante su incorporación a una solución de una sustancia de enlace selectivo resulta ventajosa porque resulta eficaz a la hora de mejorar el rendimiento de la reacción y de inmovilizar una mayor cantidad de sustancia de enlace selectivo sobre el portador.

Si los grupos carboxilo presentes en la superficie del portador se hacen reaccionar con el grupo amino de una sustancia de enlace selectivo mediante la utilización de un agente de condensación de este tipo, dicha sustancia de enlace selectivo se inmoviliza sobre la superficie del portador a través de un enlace amida, mientras que si los grupos carboxilo presentes en la superficie del portador se hacen reaccionar con el grupo hidroxilo de una sustancia de enlace selectivo, dicha sustancia de enlace selectivo se inmoviliza sobre la superficie del portador a través de un enlace éster. Cuando se hace reaccionar una muestra que contiene una sustancia de enlace selectivo con el portador, la temperatura está comprendida preferentemente entre 0°C y 95°C, más preferentemente entre 15°C y 65°C. Habitualmente, el período de tratamiento está comprendido entre 5 minutos y 24 horas, y preferentemente es de 1 hora o más.

Por otro lado, si el polímero tiene grupos de anhídrido de ácido en su superficie, dichos grupos reaccionan, por ejemplo, con el grupo amino de la sustancia de enlace selectivo y forman enlaces covalentes con o sin la adición de un agente de condensación de este tipo.

De este modo, inmovilizando una sustancia de enlace selectivo preferentemente sobre la superficie del polímero, se puede reducir la adsorción inespecífica del analito, inmovilizar la sustancia de enlace selectivo covalentemente, fuertemente y con una elevada densidad, y obtener un portador con una eficiencia de hibridación con el analito más elevada, presumiblemente porque el grado de libertad espacial de la sustancia de enlace selectivo inmovilizada es mayor que el de la sustancia inmovilizada sobre vidrio.

Si el portador se prepara con un polímero que contiene una unidad estructural representada por la fórmula general (1) ó (2), se puede obtener un portador con una estructura cóncavo-convexa de forma más sencilla y en una mayor cantidad, por ejemplo mediante moldeo por inyección o estampación en caliente, en comparación con la preparación de dicho portador con vidrio, cerámica, metal o similares. Particularmente, se aplica ventajosamente moldeo por inyección, un procedimiento que facilita la producción en masa.

Al inmovilizar una sustancia de enlace selectivo sobre la superficie polimérica del portador utilizado ventajosamente en la presente invención según el procedimiento descrito anteriormente, se puede inmovilizar una sustancia de enlace selectivo covalentemente, fuertemente y con una elevada densidad a la vez que se reduce la adsorción inespecífica del analito. Se puede obtener un portador con una eficiencia de hibridación con el analito más alta, presumiblemente porque el grado de libertad espacial de la sustancia de enlace selectivo inmovilizada es mayor que el de la formada sobre vidrio.

El portador obtenido de este modo, sobre el que se ha inmovilizado una sustancia de enlace selectivo se puede tratar adicionalmente tras la inmovilización de dicha sustancia de enlace selectivo. Por ejemplo, se puede modificar la sustancia de enlace selectivo inmovilizada mediante tratamientos tales como tratamiento térmico, tratamiento con una base o tratamiento con un tensioactivo.

Es habitual, al utilizar el portador sobre el que se inmoviliza la sustancia de enlace selectivo, hacer reaccionar un analito marcado con fluorescencia y una sustancia de enlace selectivo inmovilizada sobre un portador en una reacción de hibridación y determinar la fluorescencia del producto en un dispositivo llamado escáner. Dicho escáner desvía un rayo láser de excitación con una lente objetivo y enfoca dicho rayo láser. Sin embargo, cuando existe autofluorescencia de la superficie del portador, la misma puede provocar ruido y hacer disminuir la precisión de la detección. Para prevenir este efecto y prevenir asimismo la autofluorescencia del propio portador, resulta preferente preparar la superficie del polímero con una unidad estructural representada por la fórmula general (1) o (2) de tal modo que aparezca de color negro mediante la adición de una sustancia negra que no emita luz al ser irradiada con un láser. Mediante la utilización de un portador negro de este tipo, se puede reducir la autofluorescencia del mismo. Dicho portador negro da lugar a un portador sobre el que se inmoviliza la sustancia de enlace selectivo ventajoso, que produce menos ruido y, por lo tanto, una mayor relación señal/ruido.

El portador ennegrecido se refiere a un portador cuya zona ennegrecida tiene una reflectancia espectroscópica uniformemente baja no restringida a un patrón espectral determinado (por ejemplo, sin picos determinados) y una transmisibilidad espectroscópica uniformemente baja no restringida a un patrón espectral determinado en el intervalo de luz visible (longitud de onda: de 400 a 800 nm).

En la presente invención, el portador tiene preferentemente una reflectancia espectroscópica del 7% o menor en el intervalo de longitudes de onda de la luz visible (longitud de onda: de 400 a 860 nm) y preferentemente una transmisibilidad espectroscópica del 2% o menor en el mismo intervalo de longitudes de onda. La reflectancia espectroscópica se refiere a una reflectancia espectroscópica que incluye la luz normal reflejada por el portador, según se determina con un sistema óptico iluminador-detector compatible con la condición C de la norma JIS Z8722.

En la presente invención, el portador se puede ennegrecer incorporándole una sustancia negra, incluyéndose entre los ejemplos ventajosos de dicha sustancia negra el negro de carbono, el grafito, el negro de titanio, el negro de anilina, óxidos de metales tales como Ru, Mn, Ni, Cr, Fe, Co y Cu, carburos de metales tales como Si, Ti, Ta, Zr y Cr, y similares. Entre estas sustancias negras, resultan preferentes el negro de carbón, el grafito y el negro de titanio; y de forma particularmente preferente se utiliza negro de carbón, ya que es fácil de dispersar uniformemente en polímeros.

Estas sustancias negras pueden estar contenidas individualmente o en combinaciones de dos o más de ellas.

En cuanto a la forma del portador según la presente invención, resulta preferente una capa sobre la que se inmoviliza la sustancia de enlace selectivo constituida por un polímero que presenta, como mínimo, una unidad estructural representada por la siguiente fórmula general (1) y formada sobre una capa de soporte resistente a la deformación por calor, tal como de vidrio o de metal, ya que la misma resulta eficaz en la prevención de la deformación del portador por el calor o por una fuerza externa. En la figura 6 se ilustra un ejemplo de dicha estructura. Para la capa de soporte, resultan preferentes el polipropileno, el vidrio o un metal tal como hierro, cromo, níquel, titanio o acero inoxidable. Además, la superficie de la capa de soporte está acabada preferentemente con un tratamiento de plasma con argón, oxígeno o nitrógeno gaseoso, o se trata con un agente de acoplamiento de silano para mejorar la adhesión entre la capa de soporte y la capa sobre la que se inmoviliza una sustancia de enlace selectivo. Entre los ejemplos de agentes de acoplamiento de silano se incluyen 3-aminopropiltrimetoxisilano, 3-aminopropiltrimetoxisilano, 3-aminopropildietoximetilsilano, 3-(2-aminoetilaminopropil)trimetoxisilano, 3-(2-aminoetilaminopropil)dimetoximetilsilano, 3-mercaptopropiltrimetoxisilano, dimetoxi-3-mercaptopropilmetilsilano y similares.

La capa sobre la que se inmoviliza una sustancia de enlace selectivo se forma sobre la capa de soporte por cualquiera de los medios conocidos, por ejemplo, mediante revestimiento por rotación con una solución de un

polímero disuelto en un disolvente orgánico, o por inmersión en la misma. Más convenientemente, la capa sobre la que se inmoviliza una sustancia de enlace selectivo se puede adherir al soporte con un adhesivo.

En la presente invención, la expresión "sustancia de enlace selectivo" se refiere a una sustancia que se puede enlazar selectivamente a un analito directa o indirectamente, y entre los ejemplos típicos de la misma se incluyen ácidos nucleicos, proteínas, sacáridos y otros compuestos antigénicos.

Como "sustancia de enlace selectivo" resulta particularmente preferente un ácido nucleico. Dicho ácido nucleico puede ser ADN, ARN ó ANP. Los ácidos nucleicos monocatenarios que tienen una determinada secuencia de bases se hibridan selectivamente y se enlazan con un ácido nucleico monocatenario que tiene la secuencia de bases complementaria a dicha secuencia de bases o una parte de la misma, y por lo tanto se incluyen en las "sustancias de enlace selectivas" según la presente invención

Entre los ejemplos de proteínas se incluyen anticuerpos, fragmentos de unión al antígeno de anticuerpos, tales como los fragmentos Fab y F(ab')₂, y diversos antígenos. Los anticuerpos y sus fragmentos de unión al antígeno que se unen selectivamente a los respectivos antígenos complementarios y los antígenos que se unen selectivamente a los respectivos anticuerpos complementarios están incluidos asimismo en la expresión "sustancias de enlace selectivas". Como sacáridos resultan preferentes los polisacáridos, y entre los ejemplos de los mismos se incluyen diversos antígenos.

Alternativamente, se puede inmovilizar una sustancia antigénica que no sea ni proteína ni sacárido.

La sustancia de enlace selectivo destinada a su utilización en la presente invención puede ser un producto disponible comercialmente o una sustancia preparada a partir de células vivas o similar.

La sustancia de enlace selectivo destinada a su utilización en la presente invención es preferentemente un ácido nucleico, y entre los ácidos nucleicos, son preferentes los ácidos nucleicos con una longitud comprendida entre 10 y 100 bases, denominados ácidos oligonucleicos, que se preparan fácilmente en un sintetizador y en los que se puede modificar el grupo amino terminal para la inmovilización del ácido nucleico sobre la superficie del portador. Además, la longitud del ácido oligonucleico está comprendida preferentemente entre 20 y 100 bases, ya que la eficiencia de hibridación es menor con un ácido oligonucleico con menos de 20 bases, y de forma particularmente preferente está comprendida entre 40 y 100 bases, a fin de garantizar la estabilidad de la eficiencia de hibridación.

Entre los ejemplos de analitos que se pueden procesar por el procedimiento de agitación de una solución según la presente invención se incluyen, aunque sin limitarse a los mismos, ácidos nucleicos que se pretenden evaluar, tales como genes de bacterias y virus patógenos y genes causantes de enfermedades genéticas, o la región parcial de los mismos; diversos componentes biológicos antigénicos; anticuerpos contra bacterias y virus patógenos; y similares.

En el procedimiento de agitación de una solución según la presente invención, algunos ejemplos de muestras que contienen los analitos mencionados anteriormente son, aunque sin limitarse a los mismos, fluidos corporales tales como sangre, suero, plasma sanguíneo, orina, heces, líquido cefalorraquídeo, saliva y diversos fluidos de tejidos y diversos alimentos y bebidas, o diluyentes de los mismos, y similares.

Además, el ácido nucleico que constituye el analito se puede preparar mediante el marcaje de un ácido nucleico extraído de la sangre o una célula según un procedimiento convencional o mediante la amplificación del ácido nucleico por un método de amplificación de ácidos nucleicos tal como PCR utilizándolo como plantilla. Se puede mejorar drásticamente la sensibilidad de medición si se utiliza un analito preparado por un método de amplificación de ácidos nucleicos tal como PCR utilizando un ácido nucleico como plantilla. Si se utiliza un producto de ácido nucleico amplificado como analito, se puede marcar el ácido nucleico amplificado llevando a cabo la amplificación en presencia de un nucleótido trifosfato marcado con un material fluorescente o similar. Si el analito es un antígeno o un anticuerpo, dicho analito, antígeno o anticuerpo se puede marcar directamente por un método convencional o, alternativamente, dicho analito, antígeno o anticuerpo se puede unir primero a una sustancia de enlace selectivo; tras el lavado del soporte, el antígeno o anticuerpo se hace reaccionar con un anticuerpo o antígeno marcado que reacciona según la reacción antígeno-anticuerpo; y, a continuación, se analizan los marcajes unidos al soporte.

Preferentemente, en el procedimiento de agitación de una solución según la presente invención, se hace reaccionar una sustancia de enlace selectivo con un analito.

La etapa que consiste en hacer reaccionar una sustancia inmovilizada con un analito en el procedimiento de agitación de una solución según la presente invención se puede llevar a cabo completamente, de modo parecido a la de los métodos convencionales. La temperatura y duración de la reacción se pueden seleccionar arbitrariamente, por ejemplo, en función de la longitud de cadena del ácido nucleico que se hibrida y del tipo de antígeno y/o anticuerpo implicado en la reacción inmunitaria, pero, por lo general, la reacción se lleva a cabo a una temperatura comprendida aproximadamente entre 35°C y 70°C y durante un período comprendido aproximadamente entre 1 minuto y más de diez horas si se trata de la hibridación de un ácido nucleico, y, por lo general, a una temperatura

comprendida entre la temperatura ambiente y aproximadamente 40°C y durante un período comprendido aproximadamente entre 1 minuto y varias horas si se trata de una reacción inmunitaria.

Se ha puesto de manifiesto que el procedimiento de agitación de una solución según la presente invención presenta las siguientes ventajas, además del aumento de la intensidad de señal tras la hibridación. Los métodos convencionales de hibridación en chip de ADN han provocado el problema de la dificultad de análisis de los datos, ya que la intensidad de fluorescencia tras la hibridación es menor y la distribución de dicha intensidad de fluorescencia en el lugar en el que se inmoviliza el ADN sonda tiene forma de rosquilla. En cambio, el procedimiento de agitación de una solución según la presente invención tiene la ventaja de que mejora drásticamente la intensidad de fluorescencia y evita la distribución en forma de rosquilla de la intensidad de fluorescencia.

EJEMPLOS

A continuación se describe la presente invención con más detalle haciendo referencia a los siguientes ejemplos. Debe entenderse que la presente invención no está limitada por los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1

(Preparación de portador con ADN inmovilizado)

Se preparó un molde para moldeo por inyección según el conocido procedimiento LIGA (Lithographie Galvanoformung Abformung) y se preparó un sustrato de PMMA con la forma descrita a continuación mediante moldeo por inyección. El PMMA utilizado en este ejemplo tenía un peso molecular promedio de 50.000 y contenía negro de carbón (#3050B, fabricado por Mitsubishi Chemical Corp.) en una proporción del 1% en peso, y el sustrato tenía un aspecto negro. Cuando se determinaron la reflectancia espectroscópica y la transmisibilidad del sustrato negro, la reflectancia espectroscópica fue del 5% o menor para una longitud de onda comprendida dentro del intervalo de luz visible (longitud de onda: de 400 a 800 nm), y la transmisibilidad fue del 0,5% o menor para una longitud de onda comprendida en el mismo intervalo. El sustrato tenía un espectro uniformemente plano sin ningún patrón espectral determinado (por ejemplo, picos) tanto en reflectancia espectroscópica como en transmisibilidad en el intervalo de luz visible. La reflectancia espectroscópica se refiere a una reflectancia espectroscópica que incluye la reflectancia normal del portador según se determina con un dispositivo equipado con un sistema óptico iluminador-detector (CM-2002, fabricado por Minolta Camera) compatible con la condición C de la norma JIS Z 8722.

La forma del portador tenía 76 mm de longitud, 26 mm de anchura y 1 mm de espesor, y la superficie era plana, excepto en su zona central. Se formó una zona rebajada de 10 mm de diámetro y 0,2 mm de profundidad en el centro del portador, y en dicha zona rebajada se formaron 64 (8 x 8) zonas convexas con un diámetro de 0,2 mm en su cara superior y una altura de 0,2 mm. La diferencia entre la altura de la cara superior de las zonas convexas (promedio de las alturas de las 64 zonas convexas) en la parte convexo-cóncava y la altura de la zona plana fue de 3 µm o menor, cuando se determinó. Además, la variación de altura de las 64 caras superiores de las zonas convexas (diferencia de altura entre la cara superior más alta y la más baja), y la diferencia entre la altura de las caras superiores de las zonas convexas de la zona que presentaba una superficie convexo-cóncava y la altura de la zona plana, cuando se determinó, fue en los dos casos de 3 µm o menor. Además, el paso de las zonas convexas en la zona que presentaba una superficie convexo-cóncava (distancia entre el centro de una zona convexa al centro de otra zona convexa adyacente) era de 0,6 mm.

El portador de PMMA se sumergió en una solución acuosa 10 N de hidróxido sódico a 65°C durante 12 horas. Dicho portador se lavó con agua purificada, solución acuosa 0,1 N de HCl y agua purificada, en este orden, formándose de este modo grupos carboxilo en la superficie del portador.

(Inmovilización del ADN sonda)

Se preparó un ADN con la secuencia indicada con el número de secuencia 1 (60 bases, aminado en el extremo 5'). El ADN que presenta la secuencia indicada con el número de secuencia 1 tiene un extremo 5' aminado.

El ADN se disolvió en agua purificada hasta una concentración de 0,3 nmol/µl a fin de obtener una solución madre. Para la fijación sobre el portador, se preparó una solución de la sonda diluida con PBS (una solución de 8 g de NaCl, 2,9 g de Na₂HPO₄·12H₂O, 0,2 g de KCl y 0,2 g de KH₂PO₄ disueltos en 1 l de agua purificada que contenía ácido clorhídrico para el ajuste del pH, pH: 5,5) hasta una concentración final de 0,03 nmol/µl, que contenía adicionalmente 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) en una concentración final de 50 mg/ml para la condensación de los grupos carboxilo sobre la superficie del portador con el grupo amino terminal del ADN sonda. A continuación, la solución de mezcla se depositó en la cara superior de las zonas convexas del portador con un capilar de vidrio. A continuación, el portador se colocó en un recipiente de plástico cerrado herméticamente, se incubó a 37°C y una humedad del 100% durante aproximadamente 20 horas y posteriormente se lavó con agua purificada.

La figura 7 muestra el esquema de reacción.

(Preparación del ADN de muestra)

Se utilizó como ADN analito un ADN con la secuencia indicada con el número de secuencia 4 (968 bases), que se hibrida con el ADN sonda inmovilizado sobre el portador. El procedimiento de preparación es el siguiente:

Se prepararon ADN con las secuencias número 2 y 3. Estos ADN se disolvieron respectivamente en agua purificada hasta una concentración de 100 µm. El ADN se amplificó mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa) utilizando un ADN plasmídico (Takara Bio Inc., número de producto: 3100), (número de secuencia 5: 2.264 bases) como plantilla y los ADN con las secuencias número 2 y 3 como cebadores.

Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: ExTaq (2 µl), 10X ExBuffer (40 µl) y dNTP Mix (32 µl) (estos reactivos estaban adjuntados al número de producto RRO01A fabricado por Takara Bio Inc.), una solución de número de secuencia 2 (2 µl), una solución de número de secuencia 3 (2 µl) y una solución de plantilla (número de secuencia 5) (0,2 µl) se mezclaron y se diluyeron con agua purificada hasta un volumen total de 400 µl. La mezcla líquida se dividió en cuatro microtubos y se llevó a cabo la PCR con un termociclador. El producto se purificó por precipitación con etanol y se disolvió en 40 µl de agua purificada. El análisis electroforético de parte de la solución tras la PCR confirmó que la longitud en número de bases del ADN amplificado era de aproximadamente 960 bases y se amplificó el ADN de número de secuencia 4 (968 bases).

A continuación, se disolvió un cebador aleatorio de 9 bases (fabricado por Takara Bio Inc., número de producto: 3802) hasta una concentración de 6 mg/ml y se añadieron 2 µl del mismo a la solución de ADN purificada tras la reacción PCR.

La solución se calentó a 100°C y se enfrió sobre hielo. Se añadieron 5 µl del tampón adjuntado al fragmento Klenow (fabricado por Takara Bio Inc., número de producto 2140AK) y 2,5 µl de una mezcla de dNTP (que contenía dATP, dTTP y dGTP, cada uno de ellos en una concentración de 2,5 mM, y dCTP en una concentración de 400 µM). Además, se añadieron 2 µl de Cy3-dCTP (fabricado por Amersham Pharmacia Biotech, número de producto PA53021). Tras la adición de 10 U de fragmento Klenow a la solución, la mezcla se incubó a 37°C durante 20 horas a fin de obtener un ADN de muestra marcado con Cy3. La utilización del cebador aleatorio durante el marcaje dio lugar a una fluctuación en la longitud del ADN de muestra. El ADN de muestra más largo es el ADN de número de secuencia 4 (968 bases). El análisis electroforético de parte de la solución de ADN de muestra dio como resultado la banda más intensa en la zona que corresponde aproximadamente a 960 bases y bandas ligeramente difuminadas en la zona correspondiente a longitudes de bases más cortas. A continuación, el producto se purificó por precipitación con etanol y se secó.

El ADN analito marcado se disolvió en 400 µl de una solución que contiene el 1% en peso de BSA (seroalbúmina bovina), 5xSSC (5xSSC es una solución 20xSSC (fabricada por Sigma) diluida cuatro veces con agua purificada, 10xSSC es una solución 20xSSC diluida dos veces con agua purificada, 20xSSC diluida dos veces es 10xSSC, ésta diluida 100 veces es 0,2xSSC), el 0,1% en peso de SDS (dodecilsulfato de sodio), y el 0,01% en peso de solución de ADN de esperma de salmón (concentraciones anteriores; concentraciones finales) a fin de obtener una solución madre para la hibridación.

En los siguientes ejemplos y ejemplos comparativos, la solución madre anterior diluida 200 veces con un 1% en peso de BSA, 5xSSC, un 0,01% en peso de ADN de esperma de salmón y un 0,1% en peso de solución de SDS (todas concentraciones finales) se utilizó como solución de analito durante la hibridación, a menos que se especifique lo contrario. Se determinó que la concentración de ADN analito en la solución era de 1,5 ng/µl.

(Modificación de la superficie de las bolas de vidrio)

Se sumergieron 10 g de bolas de vidrio con un diámetro de 150 µm en una solución de NaOH 10 N y, a continuación, se lavaron con agua purificada. A continuación, se disolvió APS (3-aminopropiltriethoxisilano; fabricado por Shin-Etsu Chemical Co., Ltd.) en agua hasta una concentración del 2% en peso y las bolas de vidrio se sumergieron en esta solución durante 1 hora, y, después de retirarse, se secaron a 110°C durante 10 minutos. De este modo, se introdujeron grupos amino en la superficie de las bolas de vidrio.

A continuación, se disolvieron 5,5 g de anhídrido succínico en 335 ml de 1-metil-2-pirrolidona. Se añadieron 50 ml de borato de sodio 1 M (que contenía 3,09 g de ácido bórico e hidróxido de sodio para ajustar el pH en 50 ml de agua purificada, pH: 8,0) a la solución de ácido succínico. La placa de vidrio anterior se sumergió en la mezcla líquida durante 20 minutos. Tras la inmersión, la placa de vidrio se lavó con agua purificada y se secó. De este modo, se hicieron reaccionar los grupos amino presentes en la superficie de la placa de vidrio y el anhídrido succínico, con lo que se introdujeron grupos carboxilo en la superficie de vidrio.

(Hibridación)

El ADN analito se aplicó sobre el portador en el que se había inmovilizado el ADN sonda obtenido anteriormente para la hibridación. Específicamente, se aplicaron 50 µl de la solución de hibridación gota a gota sobre el portador en

el que se había inmovilizado el ácido nucleico sonda sobre las zonas convexas preparadas anteriormente; se añadieron 2 mg de las bolas de vidrio con la superficie modificada a la zona cóncava del portador; y el portador se cubrió con un vidrio cubreobjetos. Además, el cubreobjetos se selló con una cinta de papel para evitar la evaporación de la solución de hibridación. Se utilizó un cubreobjetos que incorporaba resinas fotosensibles con un espesor de 8 μm y una anchura de 1 mm formadas por fotolitografía en dos lados opuestos de los cuatro lados. De esta manera, la distancia (separación) entre las zonas convexas del portador y el cubreobjetos se mantuvo en 8 μm durante la hibridación. Se fijó en un recipiente de plástico sobre la placa giratoria de un agitador de microtubos (fabricado por As One, número de producto: 1-4096-01) y se incubó a 65°C y una humedad del 100% durante 10 horas. A continuación, la frecuencia de rotación del agitador se ajustó a 3 rpm y el ángulo en la dirección perpendicular a la placa giratoria de dicho agitador. Además, la cara del portador sobre la que se inmovilizó el ADN sonda se colocó en la dirección perpendicular a la placa giratoria del agitador. Tras la incubación, se retiró el cubreobjetos del portador y éste se lavó y se secó.

(Medición)

Tras el tratamiento, el portador se colocó en un escáner para chip de ADN (GenePix4000B, fabricado por Axon Instruments) y se determinó la intensidad de fluorescencia del mismo con una salida del láser del 33% y una ganancia del fotomultiplicador de 500. Los resultados se indican en la tabla 1. La intensidad de fluorescencia es el promedio de la intensidad de fluorescencia de cada punto.

Aunque en este ejemplo se utilizaron bolas de vidrio, se obtuvieron resultados parecidos a los de la tabla 1 cuando se utilizaron bolas de cerámica o de Teflon (marca registrada).

Ejemplo comparativo 1

Se llevó a cabo un experimento sin incorporar bolas de vidrio. El procedimiento de dicho experimento fue parecido al del ejemplo 1, excepto que no se mezclaron bolas de vidrio durante la hibridación. Los resultados se indican en la tabla 1.

Se puso de manifiesto que la intensidad de fluorescencia era menor que en el ejemplo 1. Además, la distribución de la intensidad de fluorescencia en las zonas convexas del portador fue desigual (en forma de rosquilla) en el ejemplo comparativo 1, mientras que fue prácticamente uniforme en el ejemplo 1.

Ejemplo comparativo 2

Se llevó a cabo un experimento con un portador plano de PMMA sin zona convexo-cóncava. El procedimiento de dicho experimento fue parecido al del ejemplo 1, excepto que (1) se utilizó un portador plano, (2) el ADN sonda se fijó en una máquina especial para este propósito (Gene Stamp II, fabricada por Nippon Laser & Electronics Co., Ltd.) y (3) se formó una abertura para la agitación de las bolas entre el portador y el vidrio cubreobjetos fijando una película de poliéster con un grosor de 200 μm y una anchura de 1 mm en cuatro lados del cubreobjetos y se mezclaron las bolas y una solución de analito en dicha abertura para la hibridación. La comparación con los resultados del ejemplo 1 ponen de manifiesto que la intensidad de fluorescencia es menor. Los resultados se indican en la tabla 1. También se confirmó que se habían producido daños en los puntos de medición que no se habían observado en el ejemplo 1. Todo indicaba que las bolas habían sido la causa de dichos daños provocados en la cara en la que se había inmovilizado la sonda durante la hibridación.

Cuando se repitió el experimento en otro ejemplo comparativo después de cambiar el diámetro de las bolas a 1 μm , la intensidad de fluorescencia fue aún menor, llegando aproximadamente a 1.500. Aparentemente, esto fue debido a que las bolas eran menos móviles por la resistencia de la solución de hibridación.

Ejemplo 3

Se llevó a cabo un experimento parecido al del ejemplo comparativo 2 utilizando un recipiente para la solución -4- con la estructura cuya sección transversal se muestra en la figura 2 en lugar de un vidrio cubreobjetos. Es decir, la estructura convexo-cóncava no se formó en el portador, sino en la cubierta. El recipiente y el portador plano de PMMA se dispusieron cuidadosamente con la relación espacial que se muestra en la figura 2. En la hibridación posterior con agitación de las bolas, las bolas de vidrio se pudieron desplazar sin contactar con la cara -1- sobre la que se había inmovilizado el ADN sonda, dado que la distancia entre la cara sobre la que se había inmovilizado el ADN sonda y el recipiente para la solución -4- era menor que el diámetro de las bolas de vidrio -2-. Los resultados se indican en la tabla 1. La intensidad de fluorescencia obtenida fue parecida a la del ejemplo 1. Teniendo en cuenta los resultados del ejemplo comparativo 2, parece importante que las bolas no entren en contacto con la cara sobre la que se ha inmovilizado la sonda. En el procedimiento de este ejemplo, es importante la colocación precisa de las zonas convexas de la cubierta y la región donde se ha inmovilizado la sonda.

Ejemplo comparativo 3

Se llevó a cabo un experimento sin agitación de las bolas utilizando un portador plano de PMMA sin ninguna zona convexo-cóncava. Dicho experimento se llevó a cabo en cuanto a procedimiento y mediciones de modo parecido al ejemplo comparativo 2, excepto que no se añadieron bolas a la solución de hibridación y no se produjo ninguna rotación. Los resultados se indican en la tabla 1.

Tabla 1

	Ejemplo 1	Ejemplo 3	Ejemplo comparativo 1	Ejemplo comparativo 2	Ejemplo comparativo 3
Concentración diana (ng/μl)	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Forma del sustrato	convexo-cóncava	Placa plana	convexo-cóncava	placa plana	placa plana
Separación (μm)	8	8	8	200	8
Procedimiento de agitación	Bola	Bola	No	Bola	No
Rotación	Sí	Sí	Sí	Sí	No
Intensidad de fluorescencia	12.000	11.800	2.900	3.900	700
Ruido	45	300	50	300	300

Ejemplo 4

En este experimento se utilizaron cinco tipos de bolas de vidrio según el ejemplo 1. El procedimiento del experimento fue parecido al del ejemplo 1, y el diámetro de las bolas de vidrio fue de 10, 20, 50, 100 ó 200 μm. Los resultados se indican en la tabla 2.

Ejemplo comparativo 4

Se llevó a cabo un experimento de modo parecido al ejemplo 1, excepto que el diámetro de las bolas de vidrio se cambió a 300 μm ó 400 μm. Los resultados se indican en la tabla 2.

Tabla 2

	Ejemplo 4					Ejemplo comparativo 4	
Tamaño (μm)	10	20	50	100	200	300	400
Intensidad de fluorescencia	8.200	10.500	12.700	12.000	12.500	3.100	3.000

Tal como se puede observar en la tabla, las bolas con un diámetro comprendido entre 10 ó 200 μm mostraron una eficacia de agitación significativamente mayor, mientras que las bolas del ejemplo comparativo 4, con un diámetro de 300 ó 400 μm, no resultaron significativamente eficaces. Dado que la distancia entre la parte cóncava del portador y el vidrio cubreobjetos era de 208 μm, todo indica que las bolas con un diámetro de 300 ó 400 μm añadidas no podían migrar por culpa de que quedaban retenidas en el espacio de separación entre el cubreobjetos y el portador. Los resultados de los ejemplos y ejemplos comparativos revelan que la dificultad de movimiento de las bolas provoca una disminución de la intensidad de fluorescencia. Además, los resultados del ejemplo 4 indican que el tamaño de las bolas es preferentemente de 10 μm o mayor y más preferentemente de 20 μm o mayor.

Ejemplo 5

Se llevó a cabo un experimento de modo parecido al ejemplo 1 con un portador cuya forma tenía las siguientes características. se formó una zona rebajada de 10 mm de diámetro y 0,3 mm de profundidad en el centro del sustrato, y en dicha zona rebajada se formaron 64 (8 x 8) zonas convexas con un diámetro de 0,2 mm en su cara superior y una altura de 0,3 mm. Otras características del portador y del procedimiento experimental fueron parecidas a las del ejemplo 1. El diámetro de las bolas de vidrio utilizadas fue de 10, 20, 50, 100, 200 ó 300 μm. Los resultados se indican en la tabla 3.

Ejemplo comparativo 5

Se llevó a cabo un experimento de modo parecido al ejemplo 5, excepto que el diámetro de las bolas de vidrio fue de 400 μm . Los resultados se indican en la tabla 3.

5

Tabla 3

	Ejemplo 5						Ejemplo comparativo 5
Tamaño (μm)	10	20	50	100	200	300	400
Intensidad de fluorescencia	8.800	11.000	13.000	12.000	12.700	12.000	2.700

10

Las bolas con un diámetro comprendido entre 10 y 300 μm mostraron una eficacia de agitación significativamente mayor, mientras que las bolas con un diámetro de 400 μm no resultaron significativamente eficaces. Dado que la distancia entre la parte cóncava del portador y el vidrio cubreobjetos era de 308 μm , todo indica que las bolas con un diámetro de 400 μm añadidas no podían migrar por culpa de que quedaban retenidas entre el cubreobjetos y el portador. Los resultados de los ejemplos y ejemplos comparativos revelan que la dificultad de movimiento de las bolas provoca una disminución de la intensidad de fluorescencia. Además, los resultados del ejemplo 5 indican que el tamaño de las bolas es preferentemente de 10 μm o mayor y más preferentemente de 20 μm o mayor.

15

Ejemplo 6

20

Se llevó a cabo un experimento con un portador que presentaba zonas convexas con diferentes alturas. Las zonas convexas del sustrato de PMMA moldeado por inyección utilizado en el ejemplo 1 se pulieron con un papel de lija a fin de introducir variación en la altura de las caras superiores de las zonas convexas. Concretamente, se prepararon un portador (portador A) con cuatro zonas convexas 30 μm más bajas que otras zonas convexas (zonas convexas estándar) y un portador (portador B) con cuatro zonas convexas 50 μm más bajas que dichas otras zonas convexas. La diferencia de altura entre la cara de las zonas convexas que no eran las zonas convexas más bajas (zonas convexas estándar) y la cara de la zona plana era de 3 μm o menor. Se preparó un ADN sonda para su fijación de modo parecido al ejemplo 1. A continuación, la solución de ADN sonda se fijó sobre las caras de cuatro zonas convexas estándar y cuatro zonas convexas más bajas de modo parecido al ejemplo 1, y además se preparó un ADN analito de hibridación y se hibridó de modo parecido al ejemplo 1. La hibridación y la medición se llevaron a cabo de modo parecido al ejemplo 1. El promedio de las intensidades de fluorescencia de las caras de las zonas convexas estándar y el promedio de las intensidades de fluorescencia de las caras de las zonas convexas más bajas se indican en la tabla 4.

30

Tabla 4

	Ejemplo 6			
	Portador a		Portador b	
	Zona convexa estándar	Zona convexa 30 μm más baja	Zona convexa estándar	Zona convexa 50 μm más baja
Intensidad de fluorescencia	13.000	120.000	12.600	8.900

35

Los resultados ponen de manifiesto que se puede obtener una relación señal/ruido parecida a la del ejemplo 1 incluso sobre un sustrato que presenta cierta fluctuación en la altura de las zonas convexas (50 μm o menos).

Ejemplo 7

40

Se estudió también el caso en que existe cierta diferencia de altura entre la cara superior de las zonas convexas y la zona plana. Las zonas convexas del sustrato de PMMA moldeado por inyección utilizado en el ejemplo 1 se pulieron con un papel de lija a fin de obtener dos portadores con una diferencia de altura respectivamente de 30 μm (portador C) y 50 μm (portador D) entre las caras de la zona plana y la cara superior de las zonas convexas. Concretamente, el portador C presentaba zonas convexas 30 μm más altas que la zona plana. Se preparó un ADN sonda para su fijación y se fijó sobre la cara de las zonas convexas; se preparó un ADN analito; y se modificó la superficie de las bolas de vidrio de modo parecido al ejemplo 1. Se llevó a cabo la hibridación de modo parecido al ejemplo 1, excepto que se fijó una lámina de silicio (espesor: 60 μm) en lugar de formar un polímero en el vidrio cubreobjetos. El número de zonas convexas del portador sobre las que se fijó la solución de ADN fue cuatro. Se determinó el promedio de las intensidades de fluorescencia de los puntos en los que se había fijado ADN (4 zonas).

45

50

Los resultados se indican en la tabla 5.

Tabla 5

	Ejemplo 7	
	Portador c	Portador d
Intensidad de fluorescencia	11.500	8.700

Los resultados ponen de manifiesto que se puede obtener una relación señal/ruido equivalente a la del ejemplo 1 incluso cuando existe cierta diferencia de altura entre la cara superior de la zona plana y la cara superior de las zonas convexas (50 μm o menos).

Ejemplo 8

El sustrato sellado con un vidrio cubreobjetos y cinta de papel según el ejemplo 1 se colocó en un agitador Voltex (fabricado por Scientific Industries, Inc.) y se llevó a cabo la hibridación con agitación gracias al movimiento de las bolas de vidrio por vibración. El procedimiento del experimento fue parecido al del ejemplo 1, excepto que el agitador se sustituyó por un agitador Voltex. Los resultados se indican en la tabla 6. Se observó una elevada intensidad de fluorescencia.

Ejemplo 9

En el experimento, la solución de hibridación se agitó incorporando bolas magnéticas durante la hibridación y moviéndolas mediante la modificación del campo magnético externo. Los presentes inventores prepararon por primera vez el dispositivo mostrado en la figura 8, en el que un imán se desplaza con un movimiento de vaivén. Los procedimientos experimentales, (preparación del portador con ADN inmovilizado) (inmovilización del ADN sonda) (preparación del ADN analito) y (medición) fueron parecidos a los del ejemplo 1. La hibridación se llevó a cabo de modo parecido al ejemplo 1, excepto que se incorporaron 1 mg de bolas magnéticas con un diámetro de 50 μm (fabricadas por Trial Corp.) a la zona cóncava del portador en sustitución de las bolas de vidrio, y el agitador se sustituyó por la máquina preparada por los presentes inventores descrita anteriormente. Los resultados se indican en la tabla 6. Se observó una elevada intensidad de fluorescencia.

Ejemplo comparativo 6

Se llevó a cabo un experimento de modo parecido al ejemplo 9 utilizando un portador plano de PMMA sin zona convexo-cóncava. El procedimiento experimental fue parecido al del ejemplo 1, excepto que (1) se utilizó un portador plano, (2) se fijó un ADN sonda en una máquina con este propósito (Gene Stamp II, fabricada por Nippon Laser & Electronics Co., Ltd.), (3) se formó una abertura para la agitación de las bolas entre el portador y el vidrio cubreobjetos fijando una película de poliéster con un grosor de 200 μm y una anchura de 1 mm en cuatro lados del cubreobjetos y se mezclaron bolas magnéticas y una solución de analito en dicha abertura para la hibridación, y (4) el portador se colocó en la máquina preparada por los presentes inventores ilustrada en la figura 8 con la cara del vidrio cubreobjetos hacia abajo. Con la cara del cubreobjetos dirigida hacia abajo, se espera que las bolas magnéticas, que se ven atraídas hacia la cara del cubreobjetos, agiten la solución sin contactar con la cara opuesta, sobre la que se ha inmovilizado la sonda. Los resultados se indican en la tabla 6. Sólo se pudo obtener una intensidad de fluorescencia más baja que la del ejemplo 9. Además, se observaron daños en lugares en los que no se había producido ninguno en el ejemplo 9. En el ejemplo comparativo 6, las bolas magnéticas fueron atraídas por un imán agregado y solidificado en toda la anchura de 200 μm de una película de poliéster; y el agregado, que migró a la fuerza, entró en contacto con la cara en la que se había inmovilizado la sonda.

Tabla 6

	Ejemplo 8	Ejemplo 9	Ejemplo comparativo 6
Tipo de bolas	Vidrio	Material magnético	Material magnético
Fuerza externa	Vibración	Fuerza magnética	Fuerza magnética
Intensidad de fluorescencia	9.900	7.800	2.800

Ejemplo 10

Se llevó a cabo un experimento de un modo parecido al ejemplo 1, excepto que se utilizaron bolas de circonita estabilizada con óxido de itrio (que contenía óxido de itrio en una cantidad del 2,5% en moles con respecto a la circonita) con un diámetro de 125 μm . Como resultado, la intensidad de fluorescencia tras la hibridación fue prácticamente parecida. Sin embargo, las bolas eran menos móviles incluso con el movimiento de la solución cuando se incorporaron 2 mg de bolas y se colocó encima un cubreobjetos, y, de este modo, resultaba más fácil

colocar el portador. Esto es debido a que la densidad de las bolas de circona es $6,05 \text{ g/cm}^3$, tres veces mayor que la del vidrio.

Ejemplo 11

Se llevó a cabo un experimento de un modo parecido al ejemplo 1, excepto que la concentración de ADN analito se ajustó a 0,73, 0,29 ó 0,15 ng/μl. Los resultados se muestran en la figura 9. Los resultados del ejemplo 1 y el ejemplo comparativo 1 también se muestran en la figura 9.

Ejemplo comparativo 7

Se llevó a cabo un experimento de un modo parecido al ejemplo 1, excepto que la concentración de ADN analito se ajustó a 0,73, 0,29 ó 0,15 ng/μl. Los resultados se muestran en la figura 9. Los resultados del ejemplo 1 y el ejemplo comparativo 1 se muestran también en la figura 9.

De este modo, se pudo determinar la eficacia de agitación utilizando bolas para cuatro concentraciones de analito diferentes.

Ejemplo 12

Se llevó a cabo un experimento para detectar SNP (polimorfismo de un solo nucleótido) con un chip de ADN. Los procedimientos experimentales, (preparación del portador con ADN inmovilizado) (preparación del ADN analito) (modificación de la superficie de las bolas de vidrio) (hibridación) y (medición) fueron parecidos a los del ejemplo 1. La concentración del ADN analito fue de 1,5 ng/μl. Sin embargo, la hibridación se llevó a cabo a 42°C. El ADN sonda utilizado fue ADN aminado en el extremo 5' con números de secuencia 6 y 7. Los ADN con números de secuencia 6 y 7 difieren únicamente en una base. La secuencia T de 10 bases desde el extremo 5' de las dos sondas no es complementaria con el ADN analito, mientras que la otra región del ADN con número de secuencia 6 (20 bases) es completamente complementaria con el ADN analito. Los dos tipos de ADN se inmovilizaron en las zonas convexas del portador por un procedimiento parecido al del ejemplo 1. Los resultados se indican en la tabla 7. Se puede detectar una diferencia de una sola base entre dos clases de ADN sonda por el procedimiento según la presente invención.

Tabla 7

	Ejemplo 12	
Número de secuencia	6	7
Intensidad de fluorescencia	10.500	3.200

[Aplicabilidad industrial]

La presente invención da a conocer un procedimiento de agitación de una solución que acelera la reacción entre una sustancia de enlace selectivo inmovilizada sobre un portador y un analito y detecta trazas de dicho analito con una intensidad de señal alta y una relación señal/ruido elevada. Así, es posible mejorar la intensidad de la señal y la relación señal/ruido (es decir, la sensibilidad) de un portador sobre el que se inmoviliza una sustancia de enlace selectivo, tal como un chip de ADN, aplicando el procedimiento de agitación según la presente invención, y, por consiguiente, dicho procedimiento permite el análisis de trazas de una muestra clínica. La presente invención permite el diagnóstico y el examen en un entorno clínico mediante la utilización de un portador sobre el que se inmoviliza una sustancia de enlace selectivo, tal como un chip de ADN.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Toray Industries, INC.

<120> Procedimiento de agitación de una solución

<130> TD-04080-PCT

<160> 7

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 60

<212> ADN

<213> Plásmido pKF3

<400> 1

acattttgag gcatttcagt cagttgctca atgtacctat aaccagaccg ttcattctgga 60

ES 2 382 475 T3

<210> 2
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Plásmido pKF3
 <400> 2
 5 gggcgaagaa gttgtccata 20

<210> 3
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Plásmido pKF3
 <400> 3
 10 gcagagcgag gtatgtaggc 20

<210> 4
 <211> 968
 <212> ADN
 <213> Plásmido pKF3
 <400> 4
 15

20

gggcgaagaa	gttgtccata	ttagccacgt	ttaaatacaa	actggtgaaa	ctcaccacagg	60
gattggctga	gacgaaaaac	atattotcaa	taaacccttt	agggaaatag	gccagggtttt	120
caccgtaaca	cgccacatct	tgcgaaatata	tgtgtagaaa	ctgcogggaaa	tcgtcgtggt	180
attcactcca	gagcgatgaa	aacgtttcag	tttgcctcatg	gaaaaocggtg	taacaagggt	240
gaacactatc	ccatatacacc	agctcaccgt	ctttcattgc	catacgaaat	tcogtatgag	300
cattcatcag	gcgggcaaga	atgtgaataa	aggccggata	aaacttgtgc	ttatittttct	360
ttacgggtott	taaaaaggcc	gtaatatcca	gatgaacggg	ctgggttatag	gtacattgag	420
caactgactg	aaatgcctca	aaatgttctt	tacgatgcc	tgggatata	tcaacgggtg	480
tatatccagt	gatttttttc	tccattttag	cttccttagc	tcctgaaaat	ctcgataact	540
caaaaaatac	gcccggtagt	gatcttattt	cattatgggtg	aaagtggaa	cctottacgt	600
gcogatcaac	gtctcatttt	cgccaaaagt	tggcccaggg	cttcccggta	tcaacaggga	660
caccaggatt	tattttattct	gcgaagtgat	cttcggttcg	acggagttcc	actgagcgtc	720
agaccocgta	gaaaagatca	aaggatcttc	ttgagatcct	ttttttctgc	gcgtaatctg	780
ctgcttgcaa	acaaaaaac	caccgctacc	agcgggtggt	tgtttgcgg	atcaagagct	840
accaactctt	tttccgaagg	taactggctt	cagcagagcg	cagataccaa	atactgtcct	900
tttagttag	cogtagttag	gccaccactt	caagaactct	gtagcaccgc	ctacatacct	960
cgctctgc						968

<210> 5
 <211> 2246
 <212> ADN
 <213> Plásmido pKF3
 <400> 5
 25

atggcaacag tcaatcagct ggttcgaaag ccgcgagctc gtaaagtggc caaatctaac 60
 gttccggctc tcgaggcatg cccgtagaag cgtggcatat gcacacgcgt atacactact 120
 actccgaaga aaccgaattc agcgtgccc aagctttgoc gcgtacgct gaccaacggg 180
 ttccagggtca cctcatatat aggtgggtgaa ggacacaacc tgcaggaaca ctctgttata 240
 ctgatcagag gcggccgcgt taaagatctg cccgggatcc ggtaccacac cgtccgcggc 300
 gctctagact gctccggagt aaaggaccgt cgacaggatc gatcgaaata cgggtgaaaa 360
 cgtccgaagg cctaatagaa gctagcttgg cactgggcca agctgaattt ctgccattca 420
 tccgcttatt atcaattatt caggcgttag accaggcgtt taagggcacc aataactgcc 480
 ttaaaaaaat tacgccccgc cctgccaact atcgagtagc tgttgtaatt cattaagcat 540
 totgcccaga tggaagccat cacagacggc atgatgaacc tgaatcgcca gcggcatcag 600
 cacccttctg ccttgcgtat aatatttgcc catagtgaac acggggggcg agaagtgtc 660
 catatttagc aogtttaaat caaaactggg gaaactcaac cagggatagg ctgagacgaa 720
 aaacatattc tcaataaac ctttagggaa ataggccagg ttttcacogt aacacggcac 780
 atcttgogaa tatatgtgta gaaactgccg gaaatcgctg tggatttcac tccagagcga 840
 tgaacaogtt tcagtttgct catggaaaac ggtgtaacaa ggggtgaacac tatcccatat 900
 caccagctca ccgtctttca ttgccatagc aaattccgta tgagcattca tcaggcgggc 960
 aagaatgtga ataaaggccg gataaaactt gtgcttattt ttccttacgg tctttaaaaa 1020

```

ggccgtaata tccagatgaa cggctctggtt ataggtacat tgagcaactg actgaaatgc 1080
ctcaaaatgt tctttacgat gccattggga tatatcaacg gtggtatatc cagtgatttt 1140
tttctccatt ttagcttcoo tagctcctga aaatctcgat aactcaaaaa atacgcccg 1200
tagtgatctt atttcattat ggtgaaagt ggaacctctt acgtgccgat caacgtctca 1260
ttttcgccaa aagttggccc agggcttccc ggtatcaaca gggacaccag gatttattta 1320
ttctgcgaag tgatcttccg ttogacggag ttccactgag cgtcagacc cgtagaaaa 1380
atcaaaggat cttcttgaga tctttttttt ctgcgcgtaa tctgtgctt gcaaaaaaaa 1440
aaaccaccgc taccagcggg gggtttgttg ccgatcaag agctaccaac tctttttccg 1500
aaggtaactg gcttcagcag agcgcagata ccaaatactg tctttctagt gtagccgtag 1560
ttaggccacc acttcaagaa ctctgtagca ccgcctacat acctcgctct gctaattcctg 1620
ttaccagtgg ctgctgccag tggcgataag tctgtcttta ccgggttgga ctcaagacga 1680
tagttaccgg ataaggcgca ggcgtcgggc tgaacggggg gttcgtgcac acagcccagc 1740
ttggagcgaa cgacctacac cgaactgaga tacctacagc gtgagcattg agaaagcgcc 1800
acgcttcccc aaggggagaaa ggcggacagg tatccggtaa gcggcagggt cggaacagga 1860
gagcgcacga gggagcttcc agggggaaac gcctgggtatc tttatagtcc tgcgggttt 1920
cgccacctct gacttgagcg tggatttttg tgatgctcgt cagggggggc gagcctatgg 1980
aaaaacgcca gcaacgggcg ctttttacgg ttcttggcct tttgtggcc tttgtctcac 2040
atgtttcttc ctgcgttctc ccttgattct gtggataacc gtattaccgc ctttgagtga 2100
gttgataccg ctgcgcgcag ccgaacgacc gagcgcagcg agtcagttag cgaggaagcg 2160
gaagaagcat tctgaaatga gctgttgaca attaatacct gaactagtta actagtacgc 2220
aagttcacgt aaaaagggtg tcgacc 2266

```

	<210> 6	
	<211> 30	
5	<212> ADN	
	<213> Plásmido pKF3	
	<400> 6	
	tttttttt acattttgag gcatttcagt	30
10	<210> 7	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Plásmido pKF3	
	<400> 7	
15	tttttttt acattttgag acatttcagt	30

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de agitación de una solución, que comprende poner en contacto una sustancia de enlace selectivo (1) inmovilizada sobre la superficie de un portador (3) con una solución contenida en un recipiente (4) que contiene un analito que reacciona con dicha sustancia de enlace selectivo (1), y mezclar partículas finas (2) en la solución que contiene dicho analito, y mover dichas partículas finas (2) sin permitir el contacto de las mismas con la superficie sobre la que se ha inmovilizado la sustancia de enlace selectivo, caracterizado porque el portador (3) o el recipiente para la solución (4) tiene una estructura tal que las partículas finas (2) no se ponen en contacto con la superficie sobre la que se ha inmovilizado la sustancia de enlace selectivo y la anchura mínima de las partículas finas (2) es mayor que la distancia mínima entre la superficie sobre la que se ha inmovilizado la sustancia de enlace selectivo y el recipiente para la solución (4).
2. Procedimiento de agitación de una solución, según la reivindicación 1, en el que el portador (3) tiene una superficie convexo-cóncava y la sustancia de enlace selectivo (1) se inmoviliza sobre la cara superior de las zonas convexas (12).
3. Procedimiento de agitación de una solución, según la reivindicación 1, en el que el recipiente (4) para la solución tiene una estructura convexo-cóncava y la sustancia de enlace selectivo se inmoviliza bajo las zonas convexas de dicho recipiente.
4. Procedimiento de agitación de una solución, según la reivindicación 1, en el que tanto el portador (3) como el recipiente (4) tienen una estructura convexo-cóncava.
5. Procedimiento de agitación de una solución, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la solución se agita por el movimiento de las partículas finas (2).
6. Procedimiento de agitación de una solución, según la reivindicación 2, en el que la solución se agita por el movimiento de las partículas finas (2), el portador (3) tiene una superficie convexo-cóncava, la sustancia de enlace selectivo (1) es inmovilizada sobre la cara superior de las zonas convexas (12) del portador y las partículas finas se mueven en la zona cóncava.
7. Procedimiento de agitación de una solución, según la reivindicación 2, en el que el portador (3) tiene una zona plana (11) y una zona convexo-cóncava, y la altura de la cara superior de las zonas convexas (12) es prácticamente la misma, y la diferencia de altura entre la zona plana (11) y la cara superior de las zonas convexas es de 50 μm o menor.
8. Procedimiento de agitación de una solución, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las partículas finas (2) son forzadas a moverse por gravedad, fuerza magnética, vibración del portador o una combinación de las mismas.
9. Procedimiento de agitación de una solución, según la reivindicación 6, en el que la anchura máxima de las partículas finas es de 10 μm o mayor, y es menor que la diferencia de altura entre la cara superior de las zonas convexas (12) y la zona cóncava del portador.
10. Procedimiento de agitación de una solución, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la sustancia de enlace selectivo (1) es un ácido nucleico.
11. Procedimiento de agitación de una solución, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la sustancia de enlace selectivo (1) reacciona con el analito.

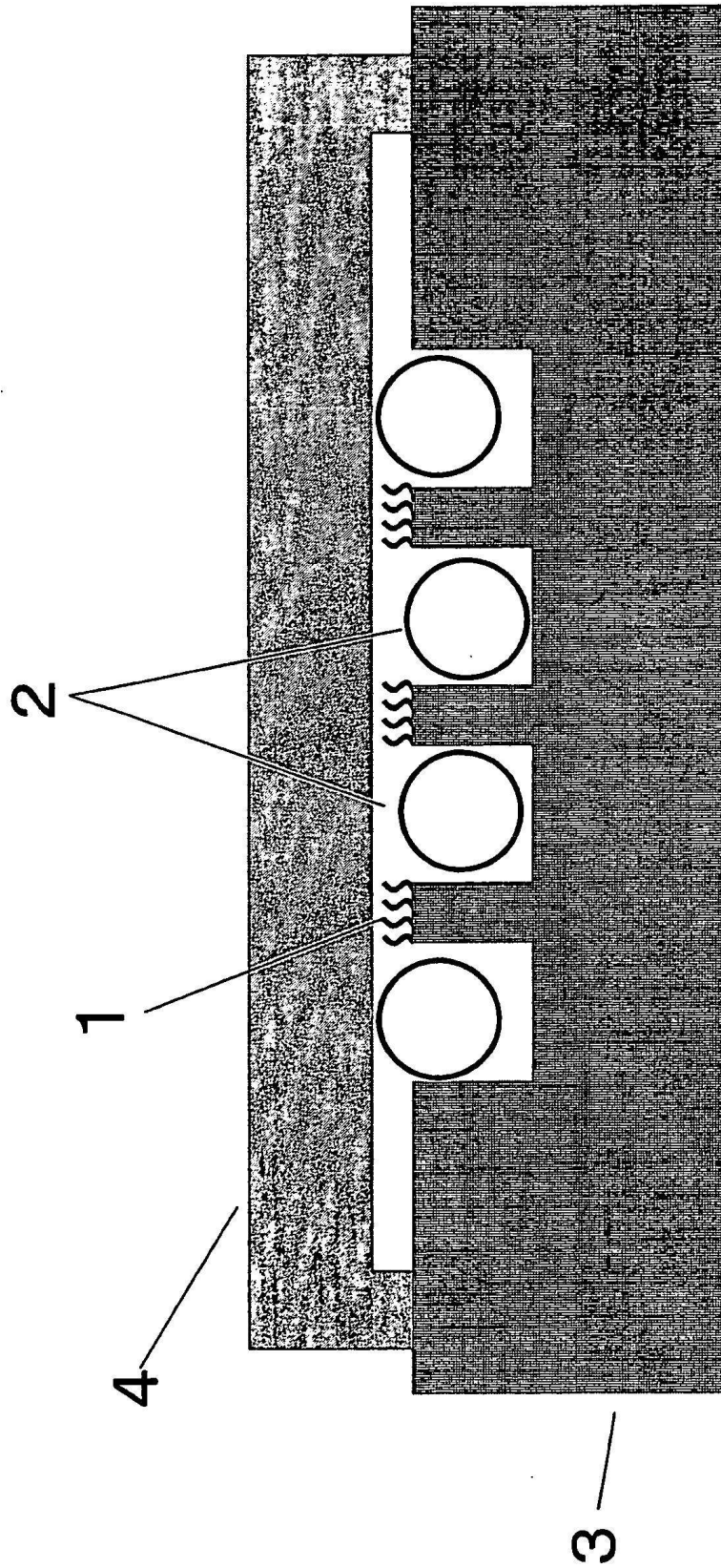


Figura 1

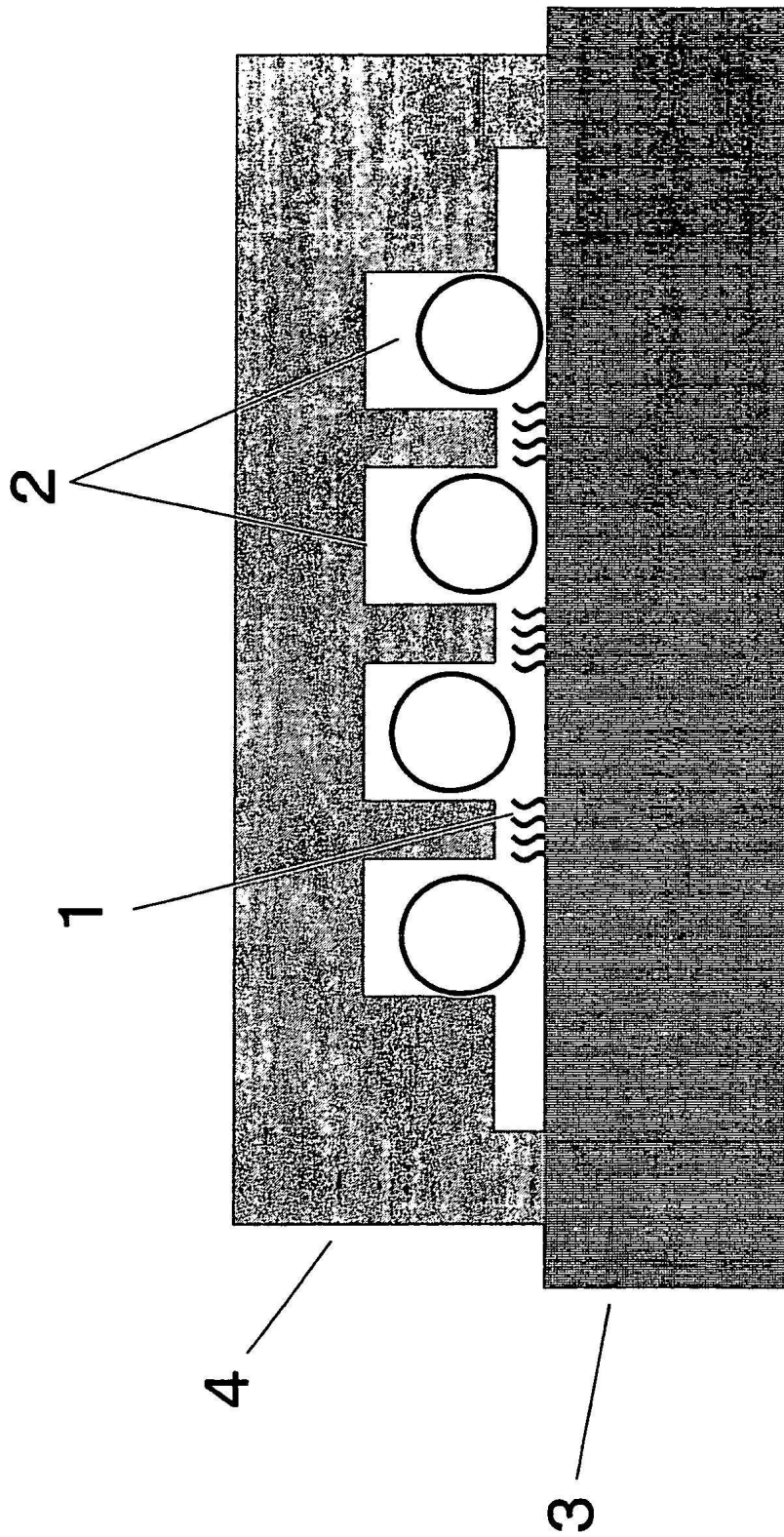


Figura 2

Figura 3

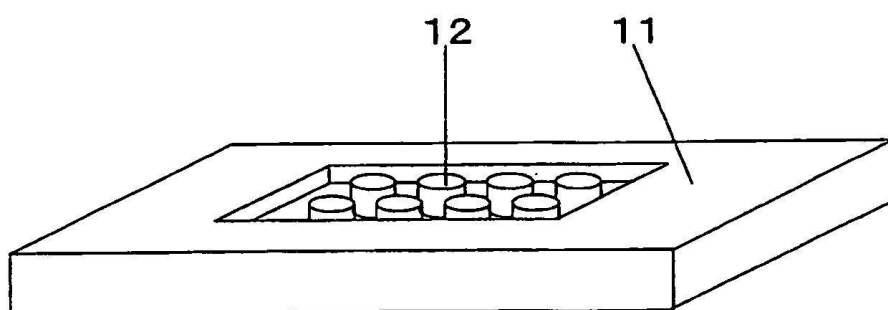


Figura 4

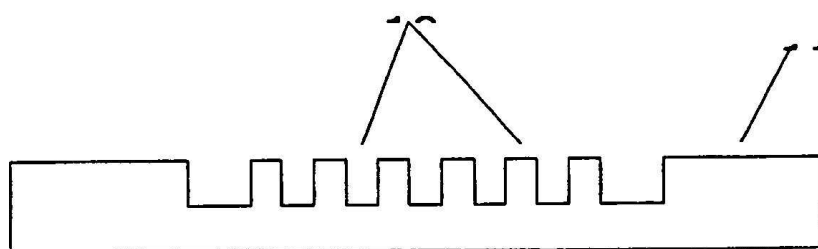


Figura 5

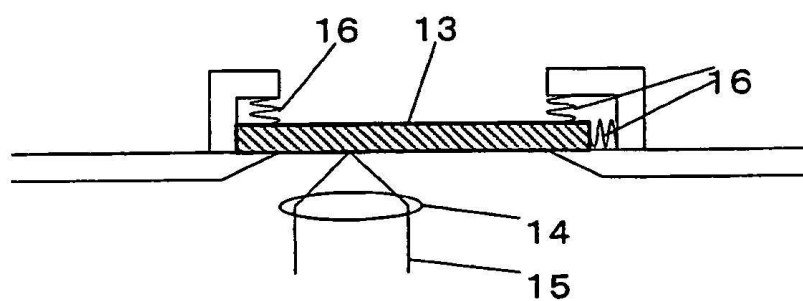


Figura 6

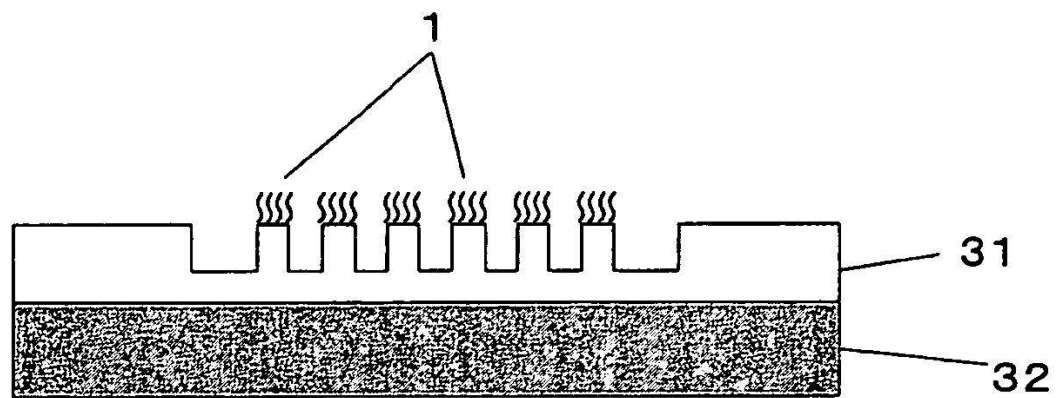


Figura 7

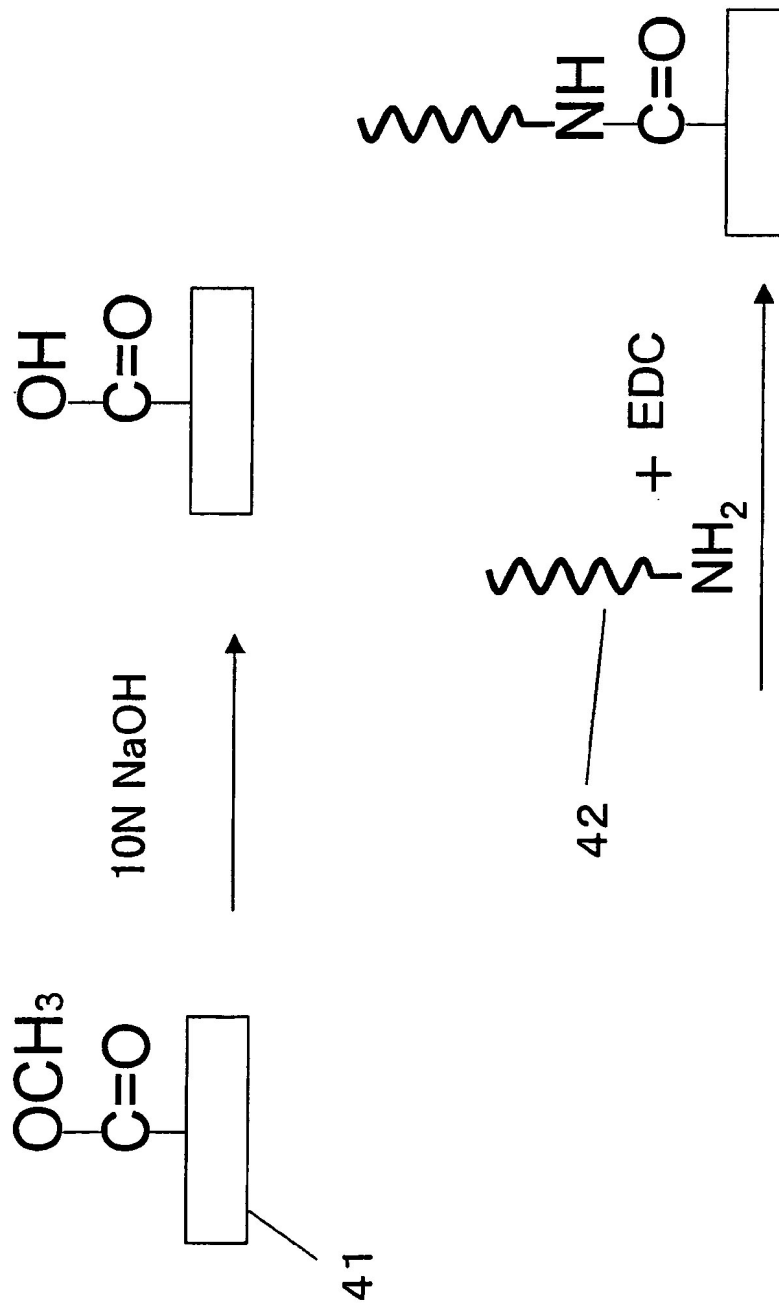


Figura 8

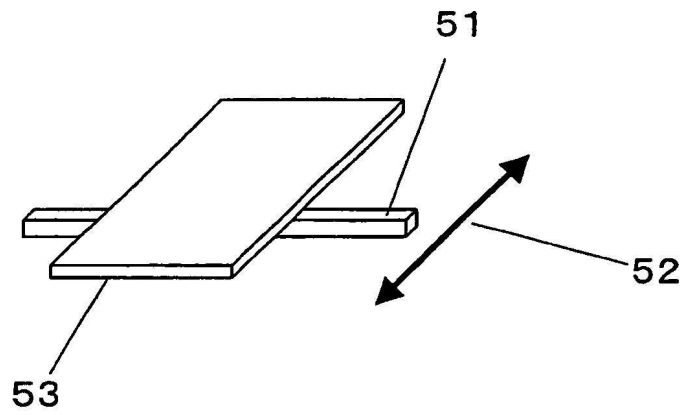


Figura 9

