

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 384 745**

51 Int. Cl.:
G01N 33/53 (2006.01)
C12M 1/00 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01)
G01N 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08703723 .0**
96 Fecha de presentación: **23.01.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2107373**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.10.2009**

54 Título: **Chip de análisis y método de análisis**

30 Prioridad:
24.01.2007 JP 2007013770

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
11.07.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
11.07.2012

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

72 Inventor/es:
NOMURA, Osamu;
KURODA, Toshihiko;
NOBUMASA, Hitoshi y
MURAO, Yasuo

74 Agente/Representante:
Temño Ceniceros, Ignacio

ES 2 384 745 T3

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

DESCRIPCIÓN

Chip de análisis y método de análisis

5 Campo de la invención:

La presente invención se refiere a un chip de análisis que tiene un sustrato en el que se inmoviliza una sustancia capaz de fijarse a una sustancia de ensayo de forma selectiva, es decir, una sustancia de fijación selectiva y un método analítico para la sustancia de ensayo utilizando el chip de análisis.

10 Antecedentes de la técnica:

Un chip de análisis tiene un sustrato en el que se inmoviliza una sustancia de fijación selectiva tal como un gen, proteína, lípido, sacárido o similares, cuya sustancia de fijación selectiva en el sustrato se le permite reaccionar con una sustancia de ensayo, la cual normalmente se encuentra en forma de solución y, del resultado de la reacción, se analiza la presencia o ausencia, condición o cantidad de la sustancia de ensayo. Los ejemplos de este sustrato generalmente incluyen aquellos hechos en vidrio, metal o resina.

En una realización de un chip de análisis, existe un chip de análisis llamado micromatriz, cuyo sustrato tiene moléculas tales como ADN que se depositan en el mismo a una alta densidad con el propósito de analizar la expresión de cientos a decenas de miles de numerosos genes al mismo tiempo. Al utilizar micromatrices, los análisis sistemáticos y exhaustivos de expresión genética pueden realizarse en diversos modelos de enfermedades animales y en fenómenos celulares biológicos. En particular, las funciones de los genes, es decir, las proteínas codificadas por los genes, pueden clarificarse y el momento de la expresión de las proteínas y los lugares donde estas actúan pueden identificarse. Se cree que buscar genes patológicos y genes terapéuticos y que encontrar métodos terapéuticos al analizar la variación en la expresión genética en organismos a nivel celular o de tejidos con los micromatrices y construir bases de datos para perfiles de expresión genética al combinar los datos resultantes con datos sobre fenómenos fisiológicos, biológico celulares y bioquímicos es posible.

En este momento, dos métodos básicos, es decir el método de Chip Genético y el método de chip de análisis ADNc, se utilizan para la preparación de chips de análisis.

El método de Chip Genético es un método desarrollado por Affymetrix, en el que se sintetizan oligo ADNs de aproximadamente 25 mer en una placa de vidrio por fotolitografía, cuyos oligo ADNs de 25 mer se diseñan con base en las secuencias base de 16 a 20 regiones por gen y el grupo de los 25 mers perfectamente apareados y el grupo de oligómeros con un desapareamiento en una base, el cual se introduce de forma intencional al cambiar la 13^a base, se utilizan en conjunto como ADN sonda. Debido a que, en este método, las longitudes de los ADN sonda son constantes y se conocen sus secuencias, el contenido GC, que afecta la intensidad de hibridación, puede hacerse constante, de tal forma que el chip anterior se considera como un chip de análisis ideal para un análisis de expresión cuantitativa. Por otro lado, el método de chip de análisis ADNc es un método desarrollado por la Universidad de Stanford, en el que el ADN se inmoviliza en una placa de vidrio por un método tal como el método de aplicación puntual o el método de chorro de tinta. Cuando se utiliza un chip de análisis preparado con cualquiera de estos métodos, una muestra (gen) a ser medida, la cual se marcó de forma fluorescente con anterioridad, se le permite fijarse al ADN sonda en el chip de análisis por hibridación y la intensidad de su fluorescencia se mide con un escáner para analizar la expresión genética.

Un ejemplo de análisis de datos de chip de análisis es el agrupamiento jerárquico. Con este método, los genes con patrones de expresión similares se agrupan para preparar un árbol filogenético y los niveles de expresión de muchos genes se representan de forma esquemática con colores diferentes. Dicho agrupamiento permite la identificación de genes relacionados con ciertas enfermedades.

Los chips de análisis se utilizan cada vez más como método para ensayar y analizar no solo ácidos nucleicos tales como el ADN sino también proteínas y sacáridos. Especialmente, en chips para el análisis de proteínas, las proteínas tales como anticuerpos, antígenos y sustratos enzimáticos se inmovilizan en el sustrato.

Cuando se utilice un chip de análisis, es importante aplicar una solución preparada que contenga la sustancia de ensayo de tal forma que la solución se extienda de forma uniforme sobre la región en el chip de análisis donde se inmovilice la sustancia de fijación selectiva. Para lograr lo anterior, se conocen chips de análisis que cuentan con partículas dentro para agitar la solución que contiene la sustancia de ensayo.

La Literatura de Patente 1 devela un chip de análisis en el que una dispersión de partículas preparada al añadir partículas a una sustancia de ensayo de solución de ADN se aplica al chip de análisis, el cual luego se cubre con una cubierta de vidrio y se sella con un agente sellante. El chip de análisis permite la hibridación con agitación utilizando el movimiento de las partículas, sin que la sustancia de ensayo se evapore.

La Literatura de Patente 2 devela un chip de análisis en el que las irregularidades se proporcionan en el sustrato del chip de análisis y se inmoviliza una sustancia de fijación selectiva en las porciones sobresalientes de las irregularidades y las partículas para agitación se contienen de forma móvil en las porciones empotradas de las

mismas, para permitir la agitación de la solución de reacción. Debido a que, en este chip de análisis, las partículas se mantienen alejadas de las superficies superiores de las porciones sobresalientes, la agitación con las partículas puede realizarse sin dañar la sustancia de fijación selectiva.

5 Sin embargo, en los chips de análisis donde la agitación se lleva a cabo utilizando las partículas tal como se describe anteriormente, cuando la solución que contiene la sustancia de ensayo se aplica a las mismas, pueden permanecer burbujas en la superficie dentro del sustrato del chip de análisis o sobre la superficie de las partículas, o pueden generarse en la solución de reacción. Existe el problema que las burbujas generadas inhiban la reacción entre la sustancia de fijación selectiva y la sustancia de ensayo en las áreas donde permanecen las burbujas.
10 Además, existe un problema de falta de uniformidad de la reacción entre las áreas donde permanecen las burbujas y las demás áreas, el cual causa una desviación en la sensibilidad de detección o una disminución en la sensibilidad de detección.

El documento EP 1 729 136 describe un chip de análisis que contiene partículas utilizadas para mezclar.

15 Además, cuando las partículas para agitar están contenidas o se inyectan en el hueco entre el sustrato del chip de análisis y la cubierta, la operación de inyectar las partículas en el espacio puede ser difícil o la inyección de una cantidad suficiente de partículas puede no llevarse a cabo debido a la generación de electrostática o por razones similares. Además, las partículas inyectadas pueden acumularse y tornarse inmóviles y, en casos donde la solución de la sustancia de ensayo se inyecta en el hueco rodeado por la cubierta y el sustrato en esas condiciones, la solución no penetra las áreas donde las partículas se acumulan, lo que resulta en un atrapamiento de burbujas, lo que causa falta de uniformidad en la reacción.

Literatura de Patente 1 JP 3557419 B
25 Literatura de Patente 2 WO 2005/090997

Divulgación de la invención:

Problemas a ser resueltos por la invención:

30 La presente invención se plantea para resolver los anteriores problemas y proporciona un chip de análisis el cual suprime la generación de burbujas que inhiben la reacción selectiva entre una sustancia de ensayo y una sustancia de fijación selectiva inmovilizada, reduciendo así la desviación de la sensibilidad de detección y la disminución de la sensibilidad de reducción causadas por la falta de uniformidad de la reacción. La presente invención también proporciona un chip de análisis que impide la acumulación de partículas para agitación y simplifica la inyección de partículas para agitación en el hueco entre el sustrato del chip de análisis y su cubierta.

Medios para resolver los problemas:

Los presentes inventores investigaron de forma exhaustiva para descubrir que los anteriores problemas podían resolverse al revestir la superficie de las partículas para agitación con un tensioactivo, completando así la presente invención.

45 Es decir, la presente invención es un chip de análisis que comprende: un sustrato con una superficie en la que se inmoviliza(n) una(s) sustancia(s) de fijación selectiva; un elemento de cubierta adherido al sustrato; un hueco entre dicho sustrato y dicho elemento de cubierta; y partículas contenidas o inyectadas en el hueco de forma móvil; estando las superficies de dichas partículas revestidas por un(os) tensioactivo(s).

En una realización preferente del chip de análisis de la presente invención, el tensioactivo que reviste la superficie de las partículas es un tensioactivo aniónico o un tensioactivo no iónico.

50 Además, una realización preferente del chip de análisis de la presente invención es un sustrato que comprende una región irregular compuesta por porciones empotradas y porciones sobresalientes, en las que la(s) sustancia(s) de fijación selectiva está(n) inmovilizada(s) en las superficies superiores de las porciones sobresalientes.

55 Además, en una realización preferente del chip de análisis de la presente invención, el material que constituye las partículas revestidas con el/los tensioactivo(s) comprende una cerámica.

Además, en una realización preferente del chip de análisis de la presente invención uno o más agujeros penetrantes que se comunican con el hueco se forman en el elemento de cubierta.

60 Además, en una realización preferente del chip de análisis de la presente invención, la distancia más corta entre la superficie del sustrato, en la que la(s) sustancia(s) de fijación selectiva está(n) inmovilizada(s), y el elemento de cubierta, es menor que el diámetro de las partículas.

65 Además, en una realización preferente del chip de análisis de la presente invención, la sustancia de fijación selectiva es un ADN, un ARN, una proteína, un péptido, un sacárido, una cadena de azúcar o un lípido.

Además, la presente invención es un método para analizar una sustancia de ensayo, comprendiendo el método las etapas de:

5 poner en contacto el chip de análisis de la presente invención en contacto con una solución que contiene la sustancia de ensayo, fijando así la sustancia de ensayo de forma selectiva a la sustancia de fijación selectiva inmovilizada en la superficie del sustrato; y
10 midiendo la cantidad de la sustancia de ensayo fijada al chip de análisis a través de la sustancia de fijación selectiva.

Una realización preferente del chip de análisis de la presente invención para analizar una sustancia de ensayo es un método en el que la solución que contiene la sustancia de ensayo se somete a un tratamiento de desgasificación antes de poner la solución que contiene la sustancia de ensayo en contacto con el chip de análisis.

15 Efectos de la invención:

De acuerdo con el chip de análisis de la presente invención, la retención y generación de burbujas en la solución de la reacción en el chip de análisis puede suprimirse. Como resultado, la desviación de la sensibilidad de detección y la disminución en la sensibilidad de detección debido a la falta de uniformidad de la reacción causada por la inhibición de la reacción entre la sustancia de fijación selectiva y la sustancia de ensayo por las burbujas puede suprimirse, permitiendo así la detección de la sustancia de ensayo con mayor sensibilidad.

Además, de acuerdo con el chip de análisis de la presente invención, la acumulación de partículas puede impedirse y la inyección de las partículas al hueco entre el sustrato del chip de análisis y su elemento de cubierta puede llevarse a cabo fácilmente y sin problemas.

Breve descripción de los dibujos:

30 La Fig. 1 es una vista trasversal que muestra un ejemplo del sustrato que constituye el chip de análisis de la presente invención esquemáticamente, en cuyo sustrato se inmoviliza la sustancia de fijación selectiva.

La Fig. 2 es una vista trasversal que muestra un ejemplo de la generación de una burbuja en la superficie del sustrato en la utilización del sustrato de la Fig. 1 esquemáticamente.

35 La Fig. 3 es una vista en perspectiva que muestra un ejemplo del sustrato que constituye el chip de análisis de la presente invención esquemáticamente, en cuyo sustrato se inmoviliza la sustancia de fijación selectiva.

40 La Fig. 4 es una vista trasversal que muestra un ejemplo del sustrato de la Fig. 3 que constituye el chip de análisis de la presente invención esquemáticamente, en cuyo sustrato se inmoviliza la sustancia de fijación selectiva.

45 La Fig. 5 es una vista longitudinal seccional que muestra un ejemplo de una plantilla y un escáner que leen resultados de una reacción utilizando el sustrato que constituye el chip de análisis de la presente invención esquemáticamente, en cuyo sustrato se inmoviliza la sustancia de fijación selectiva.

La Fig. 6 es una vista en perspectiva que muestra un ejemplo de agujeros penetrantes y de cámaras de detención de nivel de líquido.

50 La Fig. 7 es una vista transversal que muestra un ejemplo del chip de análisis de la presente invención esquemáticamente.

La Fig. 8 es una vista transversal que muestra un ejemplo del chip de análisis de la presente invención esquemáticamente.

55 La Fig. 9 es una vista transversal que muestra un ejemplo del chip de análisis de la presente invención esquemáticamente.

60 La Fig. 10 es una vista en perspectiva que muestra otro ejemplo del chip de análisis de la presente invención esquemáticamente con una estructura de partición.

La Fig. 11 es una vista longitudinal seccional que muestra otro ejemplo del chip de análisis de la presente invención esquemáticamente con una estructura de partición.

65 La Fig. 12 es una vista longitudinal seccional que muestra un ejemplo de las relaciones preferentes entre la región irregular, el elemento de cubierta y las partículas esquemáticamente.

Descripción de los símbolos:

	1	Sustrato
	2	Partículas
5	3A	Porción sobresaliente del elemento de cubierta
	3, 3B	Elemento de cubierta
	10	Porción empotrada
	11	Porción sobresaliente
	12	Región en la que se inmoviliza la sustancia de fijación selectiva (región irregular)
10	13	Área plana
	13	Porción sobresaliente del sustrato
	26	Ejemplo de burbuja generada
	30, 30C	Elemento adhesivo
	30A, 30B	Elemento adhesivo para estructura de partición
15	31	Hueco o espacio
	32	Agujero penetrante
	33	Cámara de detención de nivel de líquido
	34	Elemento sellante (cinta adhesiva)
	35	Hueco entre el sustrato y el elemento de cubierta
20	40	Resorte para impulsar el micromatriz a la plantilla
	41	Plantilla
	42	Superficie adyacente de la plantilla
	43	Lentes objetivo
	44	Luz de excitación láser
25	45	Sustancia de fijación selectiva inmovilizada en el sustrato
	L1	Punto entre las porciones sobresalientes

Mejor modalidad para llevar a cabo la invención:

30 El chip de análisis de la presente invención se caracteriza porque tiene un hueco entre el sustrato que tiene una superficie en la que se inmoviliza una sustancia de fijación selectiva y un elemento de cubierta adherido al sustrato, en la que las partículas huecas se contiene o inyectan de forma movable y las superficies de las partículas se revisten con un tensioactivo. Revestir con un tensioactivo significa que el tensioactivo se aplica o adhiere a la superficie de la partícula o que la superficie de la partícula se cubre con el tensioactivo de forma parcial o total. Este revestimiento puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante un método que se describirá más adelante.

La Fig. 1 muestra un ejemplo del chip de análisis de la presente invención que contiene partículas. En el ejemplo que se muestra en la Fig. 1, la superficie del sustrato 1 comprende regiones irregulares constituidas por porciones empotradas 10 y porciones sobresalientes 11. Las partículas 2 están contenidas en las porciones empotradas 10 y la sustancia de fijación selectiva 45 (ácido nucleico, por ejemplo) se inmoviliza en las superficies superiores de las porciones sobresalientes 11.

Al añadir una solución que contiene una sustancia de ensayo al chip de análisis para permitirle a la sustancia de ensayo reaccionar con la sustancia de fijación selectiva 45 (ácido nucleico, por ejemplo) inmovilizada en este sustrato 1, micro burbujas adheridas a las superficies de las partículas 2 se liberan en el líquido para formar una burbuja 26, la cual cubre las porciones sobresalientes tal como se muestra en la Fig. 2, de tal forma que la sustancia de fijación selectiva en las superficies de las porciones sobresalientes cubiertas no pueda reaccionar con la sustancia de ensayo. En el chip de análisis de la presente invención, en virtud del hecho que las superficies de las partículas 2 están cubiertas por un tensioactivo, las burbujas no se adhieren, o es menos probable que se adhieran, a las superficies de las partículas, permitiendo así la supresión de la generación de las burbujas. Con esto, las sustancias de fijación selectiva 45 en la superficie del sustrato 1 pueden reaccionar con la sustancia de ensayo en su totalidad y la confiabilidad y reproducibilidad de los datos obtenidos puede aumentar.

Ejemplos del método para revestir las superficies de las partículas con un tensioactivo incluyen métodos conocidos tales como: métodos en los que las partículas se sumergen en una solución que contiene el tensioactivo y se secan después de retirarse de la misma; métodos en los que la solución que contiene el tensioactivo se pulveriza sobre las superficies de las partículas, las cuales se secan posteriormente; métodos en los que las partículas se ponen en contacto con una sustancia que contiene una solución del tensioactivo; y métodos en los que las partículas se ponen en contacto con un líquido y el tensioactivo, en forma de polvo, se rocía sobre las mismas. Después de revestir las superficies de las partículas con el/los tensioactivo(s) mediante pulverización, adherencia o similar utilizando estos métodos, las partículas pueden también utilizarse después de lavar el exceso de tensioactivo con agua o un disolvente orgánico. La concentración de la solución que contiene el tensioactivo utilizada en estos métodos es preferentemente 0,01% a 10%, más preferentemente 0,05% a 2%.

65 Ejemplos del tensioactivo utilizado para el tratamiento de superficie de las partículas incluyen tensioactivos aniónicos, tensioactivos catiónicos, tensioactivos anfóteros y tensioactivos no iónicos y, entre ellos, se prefiere

utilizar los tensioactivos aniónicos y los tensioactivos no iónicos.

Ejemplos de los tensioactivos aniónicos incluyen dodecil sulfato de sodio (SDS), colato de sodio, colato de sodio, desoxicolato de sodio, lauril sarcosinato de sodio, alquil éter fosfato de polioxietileno, alquil fenil éter fosfato de polioxietileno, lauril sulfato de trietanolamina y lauroil sarcosinato de sodio.

Ejemplos de los tensioactivos catiónicos incluyen bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), aminopropiltrimetilamonio, etil sulfato de ácido graso de lanolina, cloruro de alquiltrimetilamonio, cloruro de dialquildimetilamonio, cloruro de diestearildimetilamonio, cloruro de diestearildimetilbencilamonio y cloruro de esteariltrimetilamonio.

Ejemplos de tensioactivos anfóteros incluyen 3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-2-hidroxiopropanosulfonato (CHAPSO), 3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]propanosulfonato (CHAPS) y n-dodecil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propanosulfonato (ZWITTERGENT 3-12 Detergent).

Ejemplos de tensioactivos no iónicos incluyen óxido de dimetildecilfosfina (APO-10), óxido de dodecildimetilfosfina (APO-12), lauril éter de polioxietileno (BRIJ-35), cetil éter de polioxietileno (20) (BRIJ-58), éster monooleato de sorbitán de polioxietileno (80) (polisorbato 80, Tween 80), éster monolaurato de sorbitán de polioxietileno (20) (polisorbato 20, Tween 20), polietilenglicol p-(1,1,3,3-tetrametilbutil)fenil éter (TRITON X-100), TRITON X-114, n-decanoil-N-metil-D-glucamina (MEGA-10), n-nonanoil-N-metil-D-glucamina (MEGA-9), n-octanoil-N-metil-D-glucamina (MEGA-8), nonilfenil-polietilenglicol (NP-40), polioxipropilenglicol de polioxietileno, monoestearato de etilenglicol, monoestearato de sorbitán, monoestearato de propilenglicol, monoestearato de sorbitán de polioxietileno, polioxipropileno (160) glicol de polioxietileno (30) (Pluronic F68) y polioxipropileno (67) glicol de polioxietileno (196) (Pluronic F127).

Entre ellos, debido a su fuerte efecto de activación de superficies, dodecil sulfato de sodio (SDS) y desoxicolato de sodio se utilizan preferentemente como el tensioactivo aniónico y Pluronic F68 y Pluronic F127 se utilizan preferentemente como el tensioactivo no iónico.

La forma de la partícula no se encuentra restringida siempre y cuando pueda agitar la solución de la sustancia de ensayo y la partícula puede ser de forma arbitraria, por ejemplo, un polígono o un micro-bastón (bastón fino) tal como un cilindro o un prisma, además de esferas.

El tamaño de la partícula tampoco se encuentra restringido y el diámetro de la partícula es preferentemente más pequeño que la distancia entre la superficie del sustrato en el que se inmoviliza la sustancia de fijación selectiva y el elemento de cubierta. Por ejemplo, en los casos en los que la partícula es esférica, su tamaño puede encontrarse en el rango entre 0,1 μm a 300 μm . En los casos en los que la partícula es cilíndrica, el diámetro de su superficie inferior se considera como el diámetro de la partícula y el diámetro de la superficie inferior es preferentemente más pequeño que la distancia más corta entre la superficie del sustrato en la que se inmoviliza la sustancia de fijación selectiva y el elemento de cubierta. Por ejemplo, en los casos en los que la partícula es cilíndrica, su longitud puede estar en el rango entre 50 μm y 5.000 μm y el diámetro de su superficie inferior puede estar en el rango entre 10 μm y 300 μm .

El material que constituye la partícula tampoco se encuentra restringido y ejemplos del mismo incluyen: vidrios, cerámicas (tales como itrio y circonio parcialmente estabilizado); metales y óxidos metálicos tales como oro, platino, inoxidable, hierro, óxido de aluminio (alúmina) y óxido de titanio (titania).

La superficie de la partícula que se reviste con el tensioactivo preferentemente cuenta con una rugosidad apropiada. Es decir, preferentemente, la rugosidad de eje promedio (valor Ra) es al menos 40 nm y no más de 300 nm. Al utilizar la partícula que tenga una rugosidad de superficie en este rango, aumenta el área de superficie de la perla de tal forma que la superficie de la partícula pueda revestirse con más tensioactivo. En los casos en los que la partícula esté hecha de cerámica, el valor Ra es preferentemente al menos 40 nm y no más de 200 nm teniendo en cuenta la solidez del material.

El sustrato que constituye el chip de análisis de la presente invención preferentemente tiene una región irregular, compuesta por porciones empotradas y porciones sobresalientes, en cuyas porciones sobresalientes se inmoviliza la sustancia de fijación selectiva. Debido a dicha estructura, la sustancia de ensayo que se adsorbe de forma no específica no se detecta y se reduce el ruido en el proceso de detección, lo que significa que se pueden obtener resultados con una mejor relación señal/ruido. Una razón específica para la reducción del ruido es la siguiente. Es decir, cuando el sustrato en el que se inmoviliza la sustancia de fijación selectiva en las superficies superiores de las porciones sobresalientes se escanea utilizando un aparato denominado escáner, una luz láser enfoca las superficies superiores de las porciones sobresalientes, por lo tanto la luz láser se oscurece en las porciones empotradas, para que la fluorescencia no deseada (ruido) de la sustancia de ensayo que se adsorbe de forma no específica a las porciones empotradas tenga menores posibilidades de ser detectada.

Las alturas de las porciones sobresalientes en la región irregular son preferentemente aproximadamente iguales entre ellas en términos de las alturas de las superficies superiores de las porciones sobresalientes. Aquí, las alturas

se consideran como iguales en los casos donde la sustancia de fijación selectiva se inmoviliza en las superficies de las porciones sobresalientes cuyas alturas varían en cierta medida, cuya sustancia entonces se hace reaccionar con la sustancia de ensayo marcada con fluorescencia y el escaneo lo lleva a cabo el escáner, lo que resulta en la observación de señales en las que la variación de nivel de su intensidad no causa problemas. Específicamente, las alturas son aproximadamente iguales en los casos en los que la diferencia entre las alturas no sobrepasan los 50 μm . Las diferencias entre las alturas preferentemente no sobrepasan los 30 μm y, más preferentemente, las alturas son las mismas. Tal como se utilizan en el presente, "la misma altura" incluye el error debido a la variación producida durante el proceso de producción o similar. En los casos en los que la diferencia entre la altura de la superficie superior de la porción sobresaliente más alta y la altura de la superficie superior de la porción empotrada más baja es mayor de 50 μm , la luz láser se oscurece en las superficies superiores de las porciones sobresalientes con alturas diferentes y la intensidad de la señal de la sustancia de ensayo que se hace reaccionar con la sustancia de fijación selectiva inmovilizada en dichas superficies superiores de la porción sobresaliente puede disminuir, lo que no se prefiere.

En el sustrato que constituye el chip de análisis de la presente invención, la región en la que la sustancia de fijación selectiva (ácido nucleico, por ejemplo) se inmoviliza no está restringida siempre y cuando se encuentre en la superficie del sustrato y la rugosidad tal como se describe anteriormente no se haya llevado a cabo en la misma y en particular, se encuentra preferentemente en la superficie superior (la superficie del extremo superior) de la porción sobresaliente de la región irregular descrita anteriormente. La inmovilización de la sustancia de fijación selectiva puede llevarse a cabo con anticipación; o el sustrato puede solamente prepararse sin inmovilización y, cuando se analice la sustancia de ensayo, la sustancia de fijación selectiva correspondiente a la sustancia de ensayo deseada puede seleccionarse e inmovilizarse de forma apropiada.

Como sustancia de fijación selectiva (ácido nucleico, por ejemplo), la cual puede inmovilizarse en la superficie superior de las porciones sobresalientes, se puede seleccionar una necesaria para la obtención de datos de forma apropiada, pero también puede ser simplemente una sustancia de fijación selectiva placebo. No es necesario fijar la sustancia de fijación selectiva a toda la superficie superior de las porciones sobresalientes y puede que haya superficies superiores en donde no se inmovilice nada.

En el sustrato que constituye en chip de análisis de la presente invención, cuando la(s) sustancia(s) de fijación selectiva se inmoviliza(n) en las superficies superiores de las porciones sobresalientes, las áreas de las superficies superiores de las porciones sobresalientes son preferentemente aproximadamente iguales. Las superficies superiores de las porciones sobresalientes que tienen aproximadamente las mismas áreas son ventajosas para análisis posteriores porque las áreas de las regiones en las que se inmovilizan diversos tipos de sustancias de fijación selectiva pueden hacerse iguales. Aquí, las superficies superiores se consideran como si tuviesen aproximadamente las mismas áreas en los casos en los que el valor obtenido al dividir el área más grande de la superficie superior entre las áreas de las porciones sobresalientes entre el área más pequeña de la superficie superior no sea mayor a 1,2.

El área de la superficie superior de la porción sobresaliente en la que se inmoviliza la sustancia de fijación selectiva no está restringida y es preferentemente al menos 10 μm^2 y no más de 1 mm^2 , más preferentemente al menos 300 μm^2 y no más de 0,08 mm^2 desde el punto de vista de reducir la cantidad de la sustancia de fijación selectiva y facilidad de manejo.

En el sustrato que constituye el chip de análisis de la presente invención, la superficie del sustrato, cuya superficie tiene una región en la que se inmovilizan la(s) sustancia(s) de fijación selectiva, está preferentemente rodeada por un área plana que tiene aproximadamente la misma altura que el extremo superior de la porción sobresaliente de la región irregular. Debido a dicha estructura, una solución que contenga una sustancia de ensayo puede aplicarse fácilmente a la región irregular y las partículas para agitación pueden retenerse en las porciones empotradas sin entrar en contacto con la(s) sustancia(s) de fijación selectiva.

La altura de la superficie superior de la porción sobresaliente de la región irregular y la altura del área plana son preferentemente aproximadamente las mismas. Es decir, la diferencia entre la altura del área plana y la altura de las superficies superiores de las porciones sobresalientes preferentemente no sobrepasa los 50 μm . En los casos en los que la diferencia entre la altura de la superficie superior de la porción sobresaliente y la altura del área plana sea mayor a los 50 μm , la intensidad fluorescente detectable puede disminuir, lo cual no se prefiere. La diferencia entre la altura del área plana y la altura de la superficie superior de la porción sobresaliente es más preferentemente no más de 30 μm y, lo más preferentemente, el área plana y la porción sobresaliente tienen la misma altura.

La altura de la porción sobresaliente en la región irregular del sustrato utilizado preferentemente en el chip de análisis de la presente invención, es decir, la diferencia entre la altura de la superficie superior de la porción sobresaliente y la altura de la superficie inferior de la porción empotrada es preferentemente al menos 10 μm y no más de 500 μm , más preferentemente al menos 50 μm y no más de 300 μm . En los casos en los que la altura de la porción sobresaliente sea menor a 10 μm , la sustancia de ensayo que se adsorba de forma no específica a una región diferente de las manchas puede detectarse, lo que resulta en una pobre relación señal/ruido y no se prefiere.

En los casos en los que la altura de la porción sobresaliente sea mayor a 500 μm , puede existir un problema, como por ejemplo, que la porción sobresaliente sea propensa a romperse y dañarse, lo que no se prefiere.

5 Ejemplos específicos de los sustratos que constituyen el chip de análisis de la presente invención se ejemplifican en la Fig. 3 y la Fig. 4.

10 En los ejemplos que se muestran en la Fig. 3 y Fig. 4, la superficie del sustrato 1 comprende una región irregular 12 que comprende múltiples porciones sobresalientes 11, cuya región irregular 12 está rodeada por una área plana 13. En las superficies superiores de las porciones sobresalientes 11, se inmoviliza(n) la(s) sustancia(s) de fijación selectiva (ácido nucleico, por ejemplo). La utilización de esta área plana permite un enfoque fácil de la luz de medición, tal como la luz de excitación de un escáner en la superficie superior de la porción sobresaliente. Más específicamente, cuando el enfoque se lleva a cabo para la radiación de la luz de medición, tal como un láser, en la superficie del sustrato, tal como se muestra en la Fig. 5, un resorte 40 impulsa al sustrato 1 hacia una plantilla 41 con frecuencia y el lente 43 o similar ajusta el enfoque con anticipación de tal forma que la luz láser 44 se enfoque sobre la altura de una superficie adyacente 42 de la plantilla. Al colindar el área plana del sustrato del chip de análisis de la presente invención con la superficie 42 de la plantilla, la luz de medición (la luz láser del escáner) puede enfocarse con facilidad sobre la superficie superior de la porción sobresaliente del sustrato. En el ejemplo que se muestra en la Fig. 5, el sustrato 1 se fija de tal forma que la superficie en la que se inmoviliza(n) la(s) sustancia(s) de fijación selectiva mira hacia abajo.

20 El material que constituye el sustrato del chip de análisis de la presente invención no está restringido y ejemplos del mismo incluyen vidrios, cerámicas, resinas de silicona, polietileno de tereftalato, acetato de celulosa, policarbonato, poliestireno, polimetilmetacrilato (PMMA) y cauchos de silicona tales como elastómeros de polidimetilsiloxano (PDMS). Entre ellos, se utilizan preferentemente polimetilmetacrilato, poliestireno, elastómeros de polidimetilsiloxano (PDMS), vidrios o resinas de silicona.

25 Al menos parte del sustrato del chip de análisis de la presente invención es preferentemente negro. Esto puede reducir la autofluorescencia del sustrato. La(s) parte(s) realizada(s) en negro pueden ser el cuerpo principal del sustrato que tiene la región irregular; las superficies laterales de las porciones sobresalientes; un material hidrofóbico o una capa de aislamiento proporcionada en la porción empotrada; o todos los anteriores.

30 Aquí, el sustrato se considera negro en los casos en los que la reflectancia espectral de la porción negra del sustrato no muestra un patrón espectral específico (tal como picos específicos) y es uniformemente baja y la transmitancia de la porción negra del sustrato tampoco muestra un patrón espectral específico (tal como picos específicos) y es uniformemente baja dentro de la región de longitud de onda visible (400 nm a 800 nm).

35 Al respecto de los valores de la reflectancia espectral y la transmitancia espectral, la reflectancia espectral dentro de la región de longitud de onda visible (400 nm a 800 nm) es preferentemente menos al 7% y la transmitancia espectral dentro de la misma región de longitud de onda es preferentemente menor al 2%. Tal como se utiliza en el presente, la reflectancia espectral significa una reflectancia espectral medida con reflexión especular desde el sustrato utilizando un sistema óptico de iluminación/de recepción de luz que cumpla con la condición C del documento JIS Z 8722.

40 El color negro del sustrato puede lograrse al incorporar una sustancia negra en el sustrato del chip de análisis de la presente invención. La sustancia negra no está restringida siempre y cuando no refleje luz o sea menos probable que refleje luz y que no permita la transmisión de luz o sea menos probable que permita la transmisión de luz. Los ejemplos preferidos de la misma incluyen sustancias negras tales como negro de carbón; grafito; negro de titán; negro de anilina; óxidos de Ru, Mn, Ni, Cr, Fe, Co o Cu; y carburos de Si, Ti, Ta, Zr o Cr.

45 Estas sustancias negras pueden incorporarse por separado o como mezcla de uno o más tipos. Por ejemplo, en los casos de un polímero tal como el polietileno de tereftalato o una resina de silicona, negro de carbón, grafito, negro de titán y negro de anilina entre las sustancias negras anteriormente mencionadas pueden incorporarse preferentemente y especialmente se prefiere utilizar el negro de carbón. En los casos de un material inorgánico tal como un vidrio o una cerámica, se prefiere la incorporación de un óxido metálico de Ru, Mn, Ni, Cr, Fe, Co o Cu o similares, o de un carburo de Si, Ti, Ta, Zr o Cr.

50 El sustrato que constituye el chip de análisis de la presente invención puede producirse con diversos métodos. Por ejemplo, en los casos en los que el material sea un polímero o similar, el sustrato puede moldearse con un método tal como moldeo por inyección, grabado en caliente o un método en el que la polimerización se lleva a cabo en un molde. En los casos en los que el material sea un material inorgánico tal como un vidrio o una cerámica, el sustrato puede moldearse por chorro de arena y en los casos en los que el material sea una resina de silicona, puede moldearse por un proceso de semiconductor conocido o similar.

55 El sustrato moldeado puede someterse a diversos tratamientos de superficie previos a la inmovilización de la(s) sustancia(s) de fijación selectiva en su superficie. Ejemplos específicos de dichos tratamientos de superficie incluye al descrito en el documento JP 2004-264289 A.

El chip de análisis de la presente invención puede utilizarse como un chip de análisis para analizar una sustancia de ensayo (muestra).

5 En la presente invención, el chip de análisis significa un chip utilizado para analizar la presencia o ausencia de la sustancia de ensayo, la cantidad de la sustancia de ensayo o las propiedades de la sustancia de ensayo al aplicar una solución que contenga la sustancia de ensayo en el chip. Específicamente, ejemplos del chip de análisis incluyen biochips en los que una(s) sustancia(s) de fijación selectiva inmovilizada(s) en la superficie del sustrato se le(s) permite reaccionar con la sustancia de ensayo para analizar la cantidad de la sustancia de ensayo o la presencia o ausencia de la sustancia de ensayo. Más específicamente, ejemplos de chips de análisis incluyen chips de ADN en los que se inmoviliza un ácido nucleico en la superficie de su sustrato, chips de cadenas de azúcar en los que una cadena de azúcar se inmoviliza en la superficie de su sustrato, chips celulares en los que una célula se inmoviliza en la superficie de su sustrato.

15 En la presente invención, la sustancia de fijación selectiva significa diversos materiales capaces de fijarse de forma selectiva a la sustancia de ensayo, ya sea directa o indirectamente. Ejemplos representativos de las sustancias de fijación selectiva capaces de fijarse en la superficie del sustrato incluyen ácidos nucleicos, proteínas, péptidos, sacáridos y lípidos.

20 El ácido nucleico puede ser un ADN o un ARN y también puede ser un ANP. Debido a que un ácido nucleico de cadena sencilla con una secuencia base específica se hibrida de forma selectiva con un ácido nucleico de cadena sencilla con una secuencia base complementaria con la secuencia base del ácido nucleico o parte del mismo, el ácido nucleico de cadena sencilla es una sustancia de fijación selectiva en la presente invención.

25 El ácido nucleico puede ser uno derivado de un producto natural tal como una célula viva o puede ser uno sintetizado por un sintetizador de ácidos nucleicos. La preparación de ADN o ARN a partir de células vivas puede llevarse a cabo por un método conocido, tal como, para la extracción de ADN, el método de Blin et al. (Blin et al., Nucleic Acids Res. 3:2303 (1976)) o similares y para la extracción de ARN, el método de Favaloro et al. (Favaloro et al., Methods Enzymol.65: 718 (1980) o similares. Ejemplos del ácido nucleico que puede inmovilizarse además incluyen ADNs lineales o circulares plásmidos y ADNs cromosómicos, fragmentos de ADN producidos por la digestión de estos ADNs con una enzima de restricción o un clivaje químico de los mismos, ADNs sintetizados *in vitro* con una enzima o similares u oligonucleótidos sintetizados químicamente.

35 Ejemplos de la proteína incluyen anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los anticuerpos tales como fragmento Fab y fragmento F(ab')₂ y diversos antígenos. Debido a que un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del anticuerpo se fijan de forma selectiva al antígeno correspondiente y debido a que el antígeno se fija de forma selectiva al anticuerpo correspondiente, estos son "sustancias de fijación selectiva".

40 Ejemplos del sacárido incluyen diversos monosacáridos y cadenas de azúcar tales como oligosacáridos y polisacáridos.

Ejemplos del lípido pueden incluir lípidos simples y lípidos complejos.

45 Las sustancias antigénicas diferentes de los anteriores ácidos nucleicos, proteínas, sacáridos y lípidos también pueden inmovilizarse en la superficie del sustrato como la sustancia de fijación selectiva.

Entre estas sustancias de fijación selectiva, se prefieren especialmente los ADNs, ARNs, proteínas, péptidos, sacáridos, cadenas de azúcar y lípidos.

50 El chip de análisis de la presente invención además comprende un elemento de cubierta que cubre la superficie del sustrato, cuyo elemento de cubierta se adhiere al sustrato. Al comprender el elemento de cubierta, la solución que contiene la sustancia de ensayo puede mantenerse sellada con facilidad y como resultado, la reacción entre la sustancia de ensayo y la(s) sustancia(s) de fijación selectiva inmovilizadas en la región (12 en la Fig. 3 o 4) del sustrato puede llevarse a cabo de forma estable. Las partículas pueden inyectarse (contenerse) de forma previa en el chip de análisis de la presente invención de tal forma que la solución de la sustancia de ensayo pueda aplicarse fácilmente. También tiene la ventaja de que el ruido de fondo no aumenta porque la cinta y el agente sellante no tocan la solución de la sustancia de ensayo durante la operación de cierre del agujero penetrante después de aplicar la solución de la sustancia de ensayo.

60 La Fig. 6 es una vista en perspectiva que muestra un ejemplo de las realizaciones esquemáticas del chip de análisis de la presente invención que tienen, además del sustrato, un elemento de cubierta, un elemento adhesivo, agujeros penetrantes y cámaras de detención de nivel de líquido y la Fig. 7 es una vista transversal tomada a lo largo del plano indicado por la flecha A1 en la Fig. 6. En el ejemplo que se muestra en la Fig. 7, el sustrato 1 está cubierto por el elemento de cubierta 3 a través del elemento adhesivo 30, para formar un hueco 31 que comprende la región 12 en donde la(s) sustancia(s) de fijación selectiva está(n) inmovilizada(s). El hueco 31 es un espacio cerrado que no se comunica con el exterior salvo que se comunica con el exterior a través de una pluralidad de agujeros penetrantes.

5 El elemento de cubierta puede adherirse de tal forma que cubra al menos parte de un lado de la superficie del sustrato y forme un hueco entre el sustrato y el elemento de cubierta. El sustrato preferentemente tiene una(s) sustancia(s) de fijación selectiva inmovilizada(s) en la región ubicada en el hueco, la cual es la superficie del sustrato. Es decir, el elemento de cubierta está preferentemente adherido al sustrato de tal forma que la región en la que la(s) sustancia(s) de fijación selectiva está(n) inmovilizada(s) existe en el hueco. El elemento de cubierta puede adherirse de cualquier forma siempre y cuando se forme el hueco y preferentemente se adhiera a través de un elemento adhesivo tal como una cinta doble adhesiva o una composición de resina.

10 El elemento de cubierta puede comprender uno o más agujeros penetrantes que lo comunican con el hueco y preferentemente comprende 2 o más agujeros penetrantes. Más específicamente, un hueco preferentemente tiene 2 o más agujeros penetrantes y especialmente preferentemente tiene de 3 a 6 agujeros penetrantes ya que el llenado de la solución que contiene la sustancia de ensayo es simple. Tal como se describirá más adelante, en los casos en los que el hueco está dividido en dos o más espacios que no se comunican entre sí, cada espacio preferentemente tiene 2 o más y más preferentemente de 3 a 6 agujeros penetrantes. En los casos en los que el elemento de cubierta
15 tenga 2 o más agujeros penetrantes, el tamaño de los agujeros puede ser igual o diferente y en los casos en los que uno de los 2 o más agujeros penetrantes se utilicen como entrada para la aplicación de la solución de la sustancia de ensayo mientras que el/los otro(s) funciona(n) como salida(s) de aire, el tamaño del agujero de la entrada es preferentemente lo suficientemente ancho para permitir la aplicación de la solución mientras que el tamaño del agujero del/de los otro(s) agujero(s) penetrante(s) es/son más angostos desde el punto de vista de simplicidad de
20 aplicación de la solución y retención del sellado. Específicamente, el diámetro del agujero penetrante de la entrada para aplicación se encuentra preferentemente en el rango de 0,01 mm a 2,0 mm tal como se describe más arriba y el/los diámetro(s) del/de los otro(s) agujero(s) penetrante(s) se encuentra(n) preferentemente en el rango de 0,01 mm a 1,0 mm.

25 Al menos uno de los agujeros penetrantes 32 puede tener un diámetro diferente y comprender en su extremo superior una porción con un diámetro más ancho, es decir, la cámara de detención de nivel de líquido 33. Al tener la cámara de detención de nivel de líquido, el aumento en el nivel de líquido de la solución de la sustancia de ensayo aplicada desde el agujero penetrante 32 y vertida en el hueco 31 puede suprimirse, de tal forma que el sellado del agujero penetrante con el elemento sellante 34 (Fig. 12) puede llevarse a cabo de forma simple y segura y la entrada
30 de aire a la solución de la sustancia de ensayo y la salida de la solución de la sustancia de ensayo pueden impedirse, lo que se prefiere. La forma de la cámara de detención de nivel de líquido no está restringida y la cámara puede tener forma cilíndrica, prismática, cónica, piramidal o hemisférica, o una forma similar a las anteriores. Entre ellas, se prefiere especialmente la forma cilíndrica desde el punto de vista de simplicidad de la producción, eficiencia en la supresión del aumento del nivel de líquido de la solución de la sustancia de ensayo, etc.

35 El tamaño del agujero penetrante no está restringido y en el caso de la combinación de un agujero penetrante cilíndrico 32 y una cámara de detención de nivel de líquido 33, el tamaño del agujero (diámetro) del agujero penetrante 32 es preferentemente de 0,01 mm a 2,0 mm, más preferentemente de 0,3 mm a 1,0 mm. Con un tamaño de agujero de al menos 0,01 mm, la solución de la sustancia de ensayo puede aplicarse fácilmente. Por otro
40 lado, al hacer que el diámetro del agujero penetrante 32 sea máximo 1,5 mm, la evaporación de la solución de la sustancia de ensayo después de su aplicación pero antes del sellado y similares puede suprimirse de forma efectiva. El tamaño del agujero (diámetro) de la cámara de detención de nivel de líquido 33 es preferentemente al menos 1,0 mm. Al hacer el tamaño del agujero de la cámara de detención de nivel de líquido de al menos 1,0 mm, puede obtenerse una diferencia suficiente en el tamaño relativa al agujero penetrante 32, de tal forma que pueda obtenerse
45 un efecto de detención de nivel de líquido suficiente, lo que se prefiere. El límite superior del diámetro de la cámara de detención de nivel de líquido no está restringido y debe no ser más de 10 mm. La profundidad de la cámara de detención de nivel de líquido no está restringida y puede encontrarse en el rango entre 0,1 mm a 5 mm.

50 Dicho elemento de cubierta se encuentra preferentemente adherido al sustrato anteriormente mencionado de forma movable. En los casos en los que el chip de análisis de la presente invención se utilice como un chip de ADN, normalmente es necesario leer el chip de ADN con un escáner especial. Sin embargo, es difícil colocar el chip en el escáner especial con el elemento de cubierta adherido al mismo e incluso cuando el sustrato puede colocarse en el escáner, el elemento de cubierta y el componente del sistema óptico pueden entrar en contacto entre sí al llevar a cabo la operación de escaneo, lo que puede resultar en un problema. Además, incluso cuando la lectura es posible a
55 través del elemento de cubierta, los valores de lectura pueden no ser exactos. Por lo tanto, el elemento de cubierta es preferentemente desmontable de tal forma que el elemento de cubierta pueda retirarse durante la etapa de lectura.

60 La manera en la que el elemento de cubierta se adhiere al sustrato de forma desmontable no está restringida y se prefiere una realización en la que el elemento de cubierta puede retirarse sin dañar el elemento de cubierta y el sustrato. Por ejemplo, el elemento de cubierta puede adherirse a través de un elemento adhesivo tal como una cinta doble adhesiva o una composición de resina.

65 Cuando se utilice una cinta doble adhesiva como el elemento adhesivo, preferentemente se utiliza una cinta doble adhesiva cuyos dos lados tengan diferentes fuerzas de adhesión y específicamente, la superficie con la menor fuerza de adhesión preferentemente se adhiere al lado del sustrato y la superficie con la mayor fuerza de adhesión

se adhiere al lado del elemento de cubierta. Con dicha realización, cuando se retira el elemento de cubierta, la cinta doble adhesiva y el elemento de cubierta pueden retirarse fácilmente del sustrato al mismo tiempo con la cinta doble adhesiva unida al elemento de cubierta, de tal forma que se eviten inconvenientes en la etapa de lectura debido a residuos del elemento adhesivo en el sustrato. Ejemplos de dicha cinta doble adhesiva incluyen el Producto no. 535A, producido por Nitto Denko Corporation, los Productos no. 9415PC y 4591HL, producidos por Sumitomo 3M Limited y el Producto no. 7691, producido por Teraoka Seisakusho Co., Ltd.

Cuando se utilice una composición de resina como el elemento adhesivo, ejemplos de la composición de resina que pueden utilizarse incluyen composiciones de resina que comprenden un polímero seleccionado de un grupo que consiste en polímeros acrílicos, polímeros de silicona y mezclas de los mismos. La utilización de estas composiciones de resina proporcionan un sellado mejorado en comparación con la cinta doble adhesiva y, al mismo tiempo, dichas composiciones de resina presentan una mejor estabilidad en una incubación a largo plazo, de tal forma que se prefieren especialmente en un sistema de análisis que requiera una incubación a largo plazo. Especialmente, en casos en los que se utilice un elastómero de silicona como el elemento adhesivo, se proporciona un buen desempeño sellante y la cubierta puede adherirse de tal forma que pueda retirarse fácilmente. Ejemplos específicos de dicho elastómero incluyen Sylgard (Sylgard es una marca registrada de Dow Corning) y cauchos RTV de dos componentes (para la elaboración de moldes) producidos por Shin-etsu Chemical Co., Ltd.

La forma del elemento de cubierta no está restringida siempre y cuando cubra al menos parte de un lado de la superficie del sustrato y forme un hueco entre el sustrato y el elemento de cubierta y puede ser con una estructura alrededor de la periferia de la cubierta, cuya estructura tiene una parte más sobresaliente en la porción alejada del sustrato que en la porción cercana al sustrato, es decir, una estructura protuberante. Esta estructura protuberante permite la fácil remoción del elemento de cubierta sin dañar el sustrato, lo que se prefiere.

El sustrato que constituye el chip de análisis de la presente invención en cuyo sustrato se inmoviliza(n) la(s) sustancia(s) de fijación selectiva tiene un hueco definido por la estructura que contiene el elemento de cubierta y de forma opcional el elemento adhesivo y el hueco puede ser de un único espacio o de 2 o más espacios divididos. Los 2 o más espacios divididos pueden suministrarse, por ejemplo, con una estructura de división tal como se muestra en la Fig. 8. En el ejemplo que se muestra en la Fig. 8, la porción sobresaliente 3A del elemento de cubierta y el sustrato 1 están adheridos entre sí mediante el elemento adhesivo 30A para proporcionar los espacios divididos 31. Como otro ejemplo, en el que se suministran 2 o más espacios divididos, una estructura de división tal como se muestra en la Fig. 9 también puede suministrarse. En el ejemplo que se muestra en la Fig. 9, la porción sobresaliente 14 del sustrato y el elemento de cubierta 3 se adhieren entre sí mediante el elemento adhesivo 30B para proporcionar los 2 o más espacios divididos 31. Además, como otro ejemplo, los 2 o más espacios divididos pueden proporcionarse al dividir el hueco únicamente con el elemento adhesivo 30A, sin proporcionar la porción sobresaliente para proporcionar la estructura de la división ni en el sustrato ni en el elemento de cubierta. En estos ejemplos, en los que se proporcionan 2 o más espacios divididos, los espacios 31 no se comunican entre sí y cada uno de ellos tienen uno o más agujeros penetrantes 32 y cámaras de detención de nivel de líquido 33 por separado. De esta forma, al proporcionar 2 o más espacios divididos, 2 o más tipos de solución de sustancia de ensayo pueden aplicarse sobre un chip de análisis, de tal forma que puedan analizarse 2 o más sustancias de ensayo en un chip de análisis al mismo tiempo.

El chip de análisis de la presente invención pueden tener un único elemento de cubierta o puede tener 2 o más elementos de cubierta por cada sustrato. Específicamente, tal como se muestra en la Fig. 10 o en la Fig. 11, un sustrato 1 puede tener 2 o más elementos de cubierta 3B. Cada uno de los 2 o más elementos de cubierta 3B pueden suministrarse en el sustrato 1 a través de los elementos adhesivos individuales 30C. Preferentemente, cada uno de los 2 o más elementos de cubierta 3B pueden tener el hueco 31 entre el elemento de cubierta y el sustrato 1 y pueden tener uno o más agujeros penetrantes comunicándose con cada hueco y cada elemento de cubierta 3B puede tener la región 12 en la que se inmovilizan(n) la(s) sustancia(s) de fijación selectiva por separado. Con dicha realización, el elemento de cubierta puede retirarse de forma independiente de cada una de las regiones 12 para que pueda llevarse a cabo una utilización independiente de tal forma que, por ejemplo, un análisis se lleve a cabo primero con una de las regiones 12 y el análisis posterior se lleve a cabo con otra región 12.

El material del elemento de cubierta que constituye el chip de análisis de la presente invención no está restringido y es preferentemente un material transparente para que la condición de la solución sea observable cuando se aplique la solución de la sustancia de ensayo. Ejemplos de dichos materiales incluyen vidrios o plásticos. Especialmente, desde el punto de vista de simplicidad de preparación de estructuras tales como agujeros penetrantes y cámaras de detención de nivel de líquido, puede utilizarse una resina transparente tal como poliestireno, polimetilmetacrilato, policarbonato o similar. El método de preparación del elemento de cubierta tampoco está restringido y puede fabricarse por corte o moldeo por inyección. Preferentemente se utiliza el moldeo por inyección desde el punto de vista de disponibilidad en la producción masiva.

En el chip de análisis de la presente invención, el método mediante el cual se inyectan (contienen) las partículas en el sustrato al que se adhiere el elemento de cubierta no está restringido y ejemplos del mismo incluyen un método en el que se utiliza un instrumento de forma tubular que las partículas pueden atravesar y que tiene un tubo delgado que puede insertarse en el agujero penetrante del elemento de cubierta, cuyo instrumento se inserta dentro del

agujero penetrante del elemento de cubierta y las partículas se hacen pasar a través del instrumento para inyectarse en el hueco. Ejemplos del instrumento utilizado aquí incluyen pipetas, puntas de pipetas, columnas, tubos capilares y tubos. De forma alternativa, las partículas pueden añadirse antes de la unión del elemento de cubierta a la región (la porción empotrada 10 en la Fig. 3, por ejemplo) del sustrato en la que se inmoviliza(n) la(s) sustancia(s) de fijación selectiva y el elemento de cubierta puede unirse a la misma posteriormente.

Un ejemplo preferente de las relaciones entre la región irregular, el elemento de cubierta y las partículas en el chip de análisis de la presente invención se explicarán a continuación con referencia a la Fig. 12. En el ejemplo que se muestra en la Fig. 12, la(s) sustancia(s) de fijación selectiva 45, tal como ADN, se inmoviliza(n) en las superficies superiores de las porciones sobresalientes 11 en el sustrato 1. Las partículas (perlas esféricas, en este caso) 2 se colocan en el hueco de la porción empotrada del sustrato 1. La(s) sustancia(s) de fijación selectiva 45 y las partículas 2 entran en contacto con la solución que contiene la sustancia de ensayo (no se muestra). La solución de sustancia de ensayo se retiene en el hueco definido por el sustrato 1, el elemento adhesivo 30 y el elemento de cubierta 3. En el ejemplo de la Fig. 12, la distancia más corta entre la superficie superior de la porción sobresaliente del sustrato y el elemento de cubierta 3 es menor que el diámetro de las partículas 2. Con esto, no se le permite a las partículas entrar en contacto con las superficies superiores de las porciones sobresalientes 11, de tal forma que se evite el daño a la(s) sustancia(s) de fijación selectiva 45 en la superficie superior de las porciones sobresalientes 11. En los casos en los que la partícula sea de forma no esférica tal como de forma ovalada, similarmente tampoco se les permite entrar en contacto con la superficie superior de la porción sobresaliente 11 siempre y cuando la distancia más corta entre la superficie superior de la porción sobresaliente y el contenedor sea menor que el diámetro más pequeño de la partícula, para evitar dañar la(s) sustancia(s) de fijación selectiva 45.

Dicho chip de análisis de la presente invención puede utilizarse para el análisis de diversas sustancias de ensayo. Es decir, una sustancia de ensayo se pone en contacto con el sustrato de la presente invención en el que se inmoviliza(n) una(s) sustancia(s) de fijación selectiva y se le permite a la sustancia de ensayo fijarse de forma selectiva a la(s) sustancia(s) de fijación selectiva, seguido de un análisis de la presencia/ausencia o la cantidad de la sustancia de ensayo fijada al sustrato a través de la(s) sustancia(s) de fijación selectiva, para analizar la sustancia de ensayo.

Ejemplos de la sustancia de ensayo que pueden someterse al método de medición utilizando el chip de análisis de la presente invención incluyen, pero no se limitan, a ácidos nucleicos a ser medidos, tal como los genes de bacterias patógenas, virus y similares y genes causativos de enfermedades genéticas y similares y partes de los mismos; diversos componentes biológicos con antigenidades; y anticuerpos para bacterias patógenas, virus y similares. Ejemplos de las muestras que contienen dichas sustancias de ensayo incluyen, pero no se limitan, a fluidos corporales tales como sangre, suero, plasma, orina, heces, líquido cefalorraquídeo, saliva y varios fluidos de tejidos; diversos alimentos y bebidas; y diluciones de los mismos. El ácido nucleico que se utiliza como sustancia de ensayo puede ser uno que se extrae de la sangre o de las células mediante un método convencional y se marca, o puede ser uno amplificado por un método de amplificación de ácido nucleico tal como PCR, utilizando el ácido nucleico como molde. En este último caso, la sensibilidad de medición puede promoverse enormemente. En los casos en los que se utilice un producto de la amplificación de un ácido nucleico como la sustancia de ensayo, el ácido nucleico amplificado puede marcarse al llevar a cabo la amplificación en la presencia de un nucleósido trifosfato marcado con una sustancia fluorescente o similar. En los casos en los que la sustancia de ensayo sea un antígeno o un anticuerpo, el antígeno o el anticuerpo que sea la sustancia de ensayo puede marcarse directamente con un método convencional. De forma alternativa, después de fijar el antígeno o el anticuerpo que sea la sustancia de ensayo a la(s) sustancia(s) de fijación selectiva, se lava el sustrato y un anticuerpo o antígeno marcado que se someta a una reacción antígeno-anticuerpo se hace reaccionar con el antígeno o el anticuerpo, seguido de la medición de la cantidad del marcador fijado al sustrato.

En el método de la presente invención para el análisis de una sustancia de ensayo, primero se pone en contacto a la sustancia de ensayo con el sustrato que constituye el chip de análisis de la presente invención, en cuyo sustrato se inmoviliza(n) la(s) sustancia(s) de fijación selectiva, para permitir la fijación selectiva entre la sustancia de ensayo y la(s) sustancia(s) de fijación selectiva. Es decir, la sustancia de ensayo que se somete al marcado, amplificación o similar tal como se describe más arriba se convierte en una solución acuosa o se disuelve en una solución reguladora o similar para proporcionar una solución (la cual puede denominarse una "solución de sustancia de ensayo" en la presente memoria), la cual posteriormente se pone en contacto con el sustrato.

Poner en contacto la sustancia de ensayo con el sustrato en el que se inmoviliza(n) la(s) sustancia(s) de fijación selectiva puede llevarse a cabo al inyectar la sustancia de ensayo, la cual se convirtió en una sustancia acuosa o se disolvió en una solución reguladora adecuada para proporcionar una solución, en la región irregular sobre el sustrato utilizando un instrumento convencional tal como una pipeta.

Antes de inyectar la sustancia de ensayo en el chip de análisis de la presente invención para poner la solución en contacto con el sustrato en el que se inmoviliza(n) la(s) sustancia(s) de fijación selectiva, la solución preferentemente se somete a un tratamiento de desgasificación, ya que esto puede evitar la generación de burbujas de forma efectiva. Los ejemplos preferentes del método utilizado para el tratamiento de desgasificación incluyen métodos conocidos tal como el método en el que la desgasificación se lleva a cabo utilizando una bomba de vacío o una

aspiradora para reducir la presión, un método en el que la desgasificación se lleva a cabo por centrifugado, un método por ultrasonificación y un método por calentamiento. Entre ellos, se prefiere utilizar un método en el que la desgasificación se lleva a cabo utilizando una aspiradora o una bomba de vacío para reducir la presión como un método fácil y simple. El grado de vacío en dichos casos puede ser uno que no golpee la solución y se utiliza una presión entre 10 hPa (hectopascuales) y 300 hPa, preferentemente entre 20 hPa y 200 hPa y más preferentemente entre 50 hPa y 100 hPa. El tiempo para la operación de desgasificación es preferentemente entre 2 minutos a 1 hora, más preferentemente entre 3 minutos y 30 minutos y aún más preferentemente entre 5 minutos y 20 minutos.

Cuando se utiliza el chip de análisis de la presente invención, la sustancia de ensayo puede aplicarse a través del agujero penetrante en el elemento de cubierta y el elemento sellante puede unirse al elemento de cubierta para sellar el agujero penetrante, seguido por la fijación selectiva de la sustancia de ensayo al sustrato que constituye el chip de análisis.

La aplicación de la sustancia de ensayo a través del agujero penetrante puede llevarse a cabo, por ejemplo, al inyectarla a través del agujero penetrante con un instrumento convencional tal como una pipeta.

La unión del elemento sellante al elemento de cubierta puede llevarse a cabo de una forma en la que se sellan parte o todos, preferentemente todos, los agujeros penetrantes. Ejemplos preferentes del elemento sellante incluyen cintas flexibles tal como las cintas flexibles fabricadas a partir de una película de polimida tal como KAPTON (marca registrada de Du Pont-Toray Co., Ltd.) y cintas adhesivas hechas de poliéster, celofán, cloruro de vinilo y similares, pero el elemento sellante no está restringido a las mismas y puede emplearse un elemento arbitrario que no sea flexible, en forma de placa y adhesivo, o puede emplearse un agente sellante sin forma. Desde el punto de vista de obtener un mejor efecto de la cámara de detención de nivel de líquido en la presente invención, se prefiere una cinta flexible o un elemento en forma de placa y desde el punto de vista de simplicidad de la operación y similar, se prefiere aún más una cinta flexible. En los casos en los que se emplee una cinta o un elemento en forma de placa, el número de elementos utilizados es arbitrario. Específicamente, todos los agujeros penetrantes del elemento de cubierta pueden sellarse con un único elemento sellante, o pueden emplearse 2 o más elementos sellantes, cada uno de los cuales puede utilizarse para sellar una parte de los dos o más elementos sellantes. En los casos en los que se proporcionen 2 o más elementos de cubierta en un único sustrato tal como en el caso anterior, se pueden utilizar elementos sellantes separados para los elementos de cubierta individuales, o los agujeros penetrantes en los 2 o más elementos de cubierta pueden sellarse con un único elemento sellante al mismo tiempo. Normalmente, se prefiere la utilización de un elemento sellante por cada elemento de cubierta ya que esto puede lograr un sellado simple y seguro.

A continuación se explicarán ejemplos específicos del sellado con referencia a la Fig. 12. En el ejemplo que se muestra en la Fig. 12, después de la aplicación de la solución de la sustancia de ensayo (no se muestra) a través del agujero penetrante 32, se une una cinta adhesiva flexible 34, que es el elemento sellante, para cubrir la superficie de la cámara de detención de nivel de líquido 33 en su totalidad para sellar los agujeros penetrantes. Con esta realización puede lograrse el sellado, el cual es simple y no causa la filtración de la solución de la sustancia de ensayo ni errores de medición.

En el método analítico de la presente invención, fijación selectiva significa el proceso en el que la sustancia de fijación selectiva y la sustancia de ensayo se les permite interactuar entre sí para fijar la sustancia de ensayo al sustrato en el que se inmoviliza la sustancia de fijación selectiva a través de la sustancia de fijación selectiva. En los casos del chip de análisis de la presente invención, debido a que las partículas se mueven dentro de la solución de la sustancia de ensayo por el peso, la vibración y la fuerza centrífuga causada por el movimiento y/o rotación del chip, se permite que la fijación selectiva proceda de forma eficiente.

La temperatura de reacción y el tiempo para llevar a cabo la fijación selectiva se seleccionan de forma apropiada dependiendo de la longitud de la cadena del ácido nucleico de la sustancia de ensayo a hibridarse o el/los tipo(s) de antígeno y/o anticuerpo involucrados en la inmunoreacción, y en los casos de hibridación de ácidos nucleicos, normalmente se encuentra aproximadamente entre 40 °C y 70 °C por 1 minuto hasta diez y varias horas y en los casos de inmunoreacción, normalmente se encuentran aproximadamente entre temperatura ambiente a 50 °C por 1 minuto hasta varias horas. El sustrato en el que se inmoviliza(n) la(s) sustancia(s) de fijación selectiva puede moverse y/o rotarse según sea necesario para promover la fijación selectiva.

El chip de análisis de la presente invención puede agitar la solución de la sustancia de ensayo de forma eficiente al mover las partículas durante la hibridación. Ejemplos preferentes del método para mover las partículas incluyen un método en el que el chip de análisis se rota para hacer caer las partículas en dirección de la gravedad; un método en el que el chip de análisis que contiene las partículas se coloca en un agitador para agitar o mover el sustrato; y un método en el que se utilizan partículas magnéticas y las partículas se mueven por fuerza magnética. Más preferentemente, se utiliza un método en el que se coloca el chip en un agitador y se somete a una rotación en espiral en un plano horizontal, ya que, en dicho caso, el rango de movimiento de las partículas es amplio y las partículas se mueven de forma uniforme, lo que resulta en una agitación eficiente de la solución. En dicho caso, el número de revoluciones de la rotación en espiral es preferentemente de 10 a 1.000 revoluciones/minuto, más preferentemente de 100 a 500 revoluciones/minuto.

Después de finalizar la fijación selectiva, normalmente puede someterse al chip a la etapa siguiente, seguido de la remoción del elemento de cubierta.

En el método analítico de la presente invención, una medición de la masa de la sustancia de ensayo fijada al sustrato mediante la sustancia de fijación selectiva sigue a la fijación selectiva que se describe más arriba. Esta medición también puede llevarse a cabo exactamente de la misma manera que la operación con el chip de análisis convencional. Por ejemplo, la masa de la sustancia de ensayo marcada con fluorescencia y fijada a la sustancia de fijación selectiva de forma apropiada puede medirse al leer la intensidad de su fluorescencia con un escáner conocido o similares.

En el método analítico de la presente invención, en los casos en los que se inmoviliza un ácido nucleico como la sustancia de fijación selectiva, puede medirse un ácido nucleico con una secuencia complementaria a este ácido nucleico o a una parte del mismo. En los casos en los que se haya inmovilizado un anticuerpo o un antígeno como la sustancia de fijación selectiva, puede medirse un antígeno o un anticuerpo que reaccione inmunológicamente con este anticuerpo o antígeno. Tal como se utiliza en el presente, "medición" incluye tanto detección como cuantificación.

Ejemplos

A continuación se explicará la presente invención con más detalle mediante los siguientes Ejemplos. La presente invención no está restringida a los siguientes Ejemplos.

Ejemplo 1

(1) Preparación de sustrato para chip de análisis

Utilizando el proceso LIGA (Lithographie Galvanoformung Abformung), el cual es un proceso conocido, se preparó un molde para moldeo por inyección y se obtuvo un sustrato hecho de polimetilmetacrilato (PMMA) con la forma que se describe a continuación mediante moldeo por inyección. El peso molecular promedio del PMMA utilizado fue de 50.000 y se incluyó negro de carbón (#3050B, producido por Mitsubishi Chemical) en el mismo a una proporción de 1% en peso para tornar el sustrato negro. Los resultados de la medición de la reflectancia espectral y la transmitancia espectral de este sustrato negro mostraron máximo 5% de la reflectancia espectral en cualquier longitud de onda dentro de la región de longitud de onda visible (400 nm a 800 nm) y al menos 0,5% de transmitancia dentro del mismo rango de la longitud de onda. Tanto la reflectancia espectral como la transmitancia espectral no mostraron un patrón espectral específico (tal como un pico) dentro de la región de longitud de onda visible y el espectro fue uniformemente plano. La reflectancia espectral se midió con reflexión especular desde el sustrato utilizando un dispositivo (CM-2002, producido por Minolta Camera) con un sistema óptico de iluminación/recepción de luz que satisface la condición C del documento JIS Z 8722.

El sustrato utilizado (en adelante denominado "sustrato A") tenía la forma ejemplificada en la Fig. 3 y la Fig. 4 y dimensiones externas de una longitud longitudinal de 76 mm, una longitud lateral de 26 mm y un grosor de 1 mm. En el centro del sustrato, se suministró una porción empotrada (que corresponde a la porción empotrada 10 en la Fig. 3) con dimensiones de longitud longitudinal de 39,4 mm, una longitud lateral de 19,0 mm y una profundidad de 0,15 mm en cuya porción empotrada se proporcionaron 9248 porciones sobresalientes (que corresponden a las porciones sobresalientes 11 en la Fig. 3) con un diámetro de 0,1 mm y una altura de 0,15 mm. En este sustrato A, la diferencia de altura entre las superficies superiores de las porciones sobresalientes (que corresponden a las porciones sobresalientes 11 en la Fig. 3) y la superficie superior del área plana (que corresponde a la porción sobresaliente 13) (la altura promedio de las porciones sobresaliente) no fue más de 3 μm . La variación en altura de la superficie superior de la porción sobresaliente (que corresponde a la porción sobresaliente 13) (la diferencia entre la altura de la parte más alta de la superficie superior de la porción sobresaliente y la altura de la parte más baja de la superficie superior de la porción sobresaliente) no fue de más de 3 μm . El punto entre las porciones sobresalientes (L1 en la Fig. 4; la distancia entre el centro de una porción sobresaliente y el centro de una porción sobresaliente adyacente) fue de 0,5 mm.

El anterior sustrato A se sumergió en solución acuosa de hidróxido de sodio 10N a 70 °C por 12 horas. Este se lavó de forma secuencial con agua pura, solución de HCl 0,1N y agua pura y se formaron grupos carboxilos en la superficie del sustrato.

(2) Inmovilización de las sustancias de fijación selectiva

Se inmovilizó a cada uno de los oligonucleótidos en el sustrato A como las sustancias de fijación selectiva (ADNs sonda) bajo la siguiente condición. Se utilizó el grupo de oligonucleótidos de micromatrices de ADN "Homo sapiens (humano) AROS V4.0 (de 60 bases cada uno)", producido por Operon Biotechnologies como los oligonucleótidos. Estos oligonucleótidos se disolvieron en agua pura a una concentración final de 0,3 nmol/ μl y utilizados como soluciones de reserva. Cuando la solución de reserva se aplicó puntalmente sobre el sustrato, se diluyó 10 veces con PBS (preparado al combinar 8 gr de NaCl, 2,9 gr de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0,2 gr de KCl y 0,2 gr de KH_2PO_4 ,

disolviendo los mismos en agua pura para obtener un volumen final de 1 L y luego ajustando el pH de la solución resultante a 5,5 con la adición de ácido hidroclicórico para obtener una concentración final de 0,03 nmol/ μ l para el ADN sonda, en cuya solución se añadió 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) a una concentración final de 50 mg/ml para permitir la condensación entre el grupo carboxilo formado en la superficie del sustrato hecho de PMMA y el grupo amino terminal del ADN sonda. Las soluciones se aplicaron de forma puntal respectivamente en las superficies superiores de todas las porciones sobresalientes del sustrato A utilizando un arrayer (spotter) (Gene Stamp-II, producido por Nippon Laser & Electronics Lab.). Posteriormente, el sustrato aplicado de forma puntal se incubó en un contenedor plástico a 37 °C y a una humedad del 100% por aproximadamente 20 horas. Finalmente, se lavó el sustrato con agua pura y se secó por centrifugado utilizando una secadora giratoria.

(3) Unión del elemento de cubierta al sustrato del chip de análisis

El elemento de cubierta se unió al sustrato A en el que se inmovilizaron las sustancias de fijación selectiva de la siguiente manera:

Se preparó una placa plana PMMA con dimensiones de una longitud longitudinal de 41,4 mm, una longitud lateral de 21 mm y un grosor de 1 mm por corte y se utilizó como elemento de cubierta. Los agujeros penetrantes y la cámara de detención de nivel de líquido se suministraron en el elemento de cubierta preparado tal como se ejemplifica en 32 y 33 en la Fig. 7. Una cinta doble adhesiva con un grosor de 1 mm se utilizó como el elemento adhesivo y se unió a lo largo del borde longitudinal de 41,4 mm y el borde lateral de 21 mm de tal forma que la cinta se laminó a un grosor de 50 μ m para unir el elemento de cubierta al sustrato A.

(4) Revestimiento con tensioactivo de la superficie de las partículas para agitación

En un tanque de acero inoxidable (10 cm x 10 cm x 5 cm), se colocaron 10 g de partículas hechas con circonio con un diámetro de 180 μ m (producidas por Toray Industries, Inc.) y se les añadió 50 ml de una solución acuosa de dodecil sulfato de sodio (SDS) a 0,1% como tensioactivo. Después de sonicación por 10 minutos, se retiró el sobrenadante (componente SDS) y las partículas se secaron a 70 °C por 12 horas utilizando un horno. La rugosidad de la superficie de la partícula antes del tratamiento era de 165 nm en términos de la rugosidad de eje promedio (Ra) de su superficie. La medición del valor Ra de la superficie de la partícula se llevó a cabo con un microscopio de escaneo de electrones (ESA-2000, producido por Elionix Co., Ltd.) después de la deposición al vacío de Au en su superficie. La rugosidad de eje promedio se midió en 10 partículas seleccionadas de forma arbitraria a una magnificación de 10.000x y un valor de corte de 0 y se calculó el valor promedio.

(5) Inyección (contención) de partículas en chip de análisis y evaluación de operatividad de inyección (contención)

En el sustrato A al que se unió el elemento de cubierta en la etapa anterior (3), 120 mg de partículas hechas de circonio, revestidas con el tensioactivo en la etapa anterior (3) se inyectaron (contuvieron) en el hueco formado por el sustrato A y el elemento de cubierta (la porción empotrada de la región irregular de la superficie del sustrato A). La inyección de partículas se llevó a cabo a través del agujero penetrante del elemento de cubierta (el agujero penetrante 32 ejemplificado en la Fig. 7 o la Fig. 12). El chip de análisis obtenido de esta forma se le denominará en adelante el "chip de análisis 1".

Aquí, la operatividad de la inyección de las partículas en el chip de análisis se evaluó de la siguiente manera. Al inyectar 120 mg de las partículas, la operatividad se evaluó como "A" en los casos en los que el tiempo requerido para la inyección fue menor a 3 minutos ya que la operación fue muy fácil; se evaluó como "B" en los casos en los que el tiempo requerido para la inyección fue mayor a 3 minutos y menor a 5 minutos ya que la operación fue relativamente fácil; y se evaluó como "C" en los casos en los que la inyección de toda la cantidad de partículas no se pudo lograr en menos de 5 minutos ya que la operación fue difícil o no fue fácil.

La operatividad de la inyección de las partículas en el chip de análisis 1 fue "A" (Tabla 1).

(6) Preparación de la sustancia de ensayo ADN

Se utilizó ARNa (ARN antisentido) como sustancia de ensayo, la cual es común como sustancia de ensayo. De los 5 μ g del ARN total (ARN de referencia humana producido por CLONTECH), el cual se encuentra disponible en el mercado y se deriva de células humanas cultivadas, se obtuvieron 5 μ g de ARNa marcado con Cy3 utilizando un kit de preparación para ARNa producido por Ambion.

En el presente Ejemplo, los Ejemplos siguientes y los Ejemplos Comparativos, la solución de la sustancia de ensayo utilizada para hibridación fue una que se preparó al diluir el ARNa marcado preparado con una solución de 1% en peso de BSA, 5 x SSC, 0,01% en peso de ADN de esperma de salmón y 0,1% en peso de SDS (cada concentración representa una concentración final) salvo que se especifique lo contrario.

(7) Reacción de hibridación y evaluación del número de burbujas generadas

Se inyectaron 165 μ l de la solución de la sustancia de ensayo para hibridación que contenían 200 ng de ARN marcado con Cy3 utilizando una micropipeta a través del agujero penetrante al hueco (recipiente de la reacción) entre el sustrato A y el elemento de cubierta del chip de análisis 1. La solución pudo inyectarse fácilmente en este momento y no se atrapó ninguna burbuja. Utilizando la cinta KAPTON (As One Corporation) como material sellante, se sellaron 4 agujeros penetrantes. Una cámara de hibridación (cámara de hibridación Takara (producida por Takara Bio Inc.)) se puso en estrecho contacto con y se fijó a una plataforma de agitación de láminas (MMS FIT-S, producida por Tokyo Rikakikai) y el chip de análisis 1 se colocó en la cámara de hibridación. En este momento, 15 μ l cada uno de agua ultrapura se dejaron caer en los rebajes de ambos lados de la ubicación donde se colocó el chip de análisis 1. Después de cerrar la tapa de la cámara de hibridación, el chip se fijó al apretar 6 tornillos de fijación y la cámara se fijó a un agitador (MMS-310, producido por Tokyo Rikakikai) instalado en una cámara de termostato (FMS-1000, producido por Tokyo Rikakikai), puesta a 42 °C. El lado frontal de la cámara de termostato se sombreó con papel aluminio y la cámara se incubó con agitación rotatoria a 250 revoluciones/minuto a 42 °C por 16 horas. Después de la incubación, el chip de análisis 1 se retiró de la cámara de hibridación.

A través del elemento de cubierta, se contaron las burbujas en la solución de la sustancia de ensayo observadas en el sustrato A del chip de análisis 1. Con base a los resultados obtenidos después de 10 tandas de reacción de hibridación utilizando el chip de análisis 1, el número de burbujas generadas en la solución de la sustancia de ensayo fueron 4,5 en promedio por reacción (Tabla 1).

(8) Medición de la señal de fluorescencia y evaluación de la desviación de la sensibilidad de detección

Después de la remoción del elemento de cubierta y de la cinta doble adhesiva adherida al sustrato A del chip de análisis 1, se lavó y se secó el sustrato A. Después del tratamiento anterior, el sustrato A se colocó en un escáner para chip de ADN (GenePix 4000B, producido por Axon Instruments) y se midió el valor de señal del marcado (intensidad de fluorescencia) de la sustancia de ensayo sometida a la reacción de hibridación y el ruido de fondo bajo una condición en la que el rendimiento del láser fue de 33% y el ajuste de voltaje para el fotomultiplicador fue de 500. Entre los 9248 puntos totales, se utilizaron 32 puntos como puntos de control negativo para la medición de la fluorescencia de fondo y el valor real de señal de cada punto se calculó al sustraer el valor de señal de fondo de los valores de señal individuales.

Para la evaluación de la desviación de la sensibilidad de detección debido a la falta de uniformidad de la reacción de hibridación, se llevaron a cabo 10 tandas de la reacción de hibridación utilizando el chip de análisis 1 y se calculó la desviación de los valores de la señal de fondo (valor CV = la desviación estándar de los valores de la señal de fondo en todas las tandas/el valor de la media de los valores de la señal de fondo de todas las tandas (%)) para cada reacción. Como resultado, el promedio de las desviaciones (valores CV) de los valores de la señal de fondo basado en las 10 tandas de evaluación fue 8,4% (Tabla 1).

Ejemplo 2

La evaluación utilizando el chip de análisis 1 se llevó a cabo de la misma manera que en el Ejemplo 1 salvo que la solución de la sustancia de ensayo preparada en el Ejemplo 1 (6) se sometió a un tratamiento de desgasificación de la siguiente manera:

Se añadieron 175 μ l de la solución de la sustancia de ensayo a un tubo PCR de 0,2 ml (72.737.002, producido por ASSIST) y se colocó el tubo en un desgasificador (de tipo aspiradora NDA-015, producido por ULVAC), dejando la tapa abierta para llevar a cabo la desgasificación de la solución. La presión última durante la desgasificación fue de 50 hPa de conformidad con la indicación del aparato y el periodo de tiempo para la desgasificación fue de 25 minutos.

De la misma forma que en el Ejemplo 1(7), se contaron las burbujas en la solución de la sustancia de ensayo observadas en el sustrato después de la reacción de hibridación. El número promedio de las burbujas por reacción calculadas a partir de los resultados obtenidos en 6 tandas de la reacción fue de 0,4. (Tabla 1)

Además, de la misma manera que en el Ejemplo 1 (8), se calculó la desviación de los valores de señal de fondo (valor CV), que resultó ser 6,7% (Tabla 1).

Ejemplo comparativo 1

Se preparó el "chip de análisis 2" de la misma forma que en el Ejemplo 1, salvo que las partículas hechas de circonio se utilizaron tal cual sin ser sometidas a un revestimiento con un tensioactivo (Ejemplo 1 (4)). La evaluación se llevó a cabo de la misma manera que en el Ejemplo 1 utilizando este chip de análisis 2.

El resultado de la evaluación de la operatividad de la inyección de partículas tal como en el Ejemplo 1 (5) demostró que la inclusión de las partículas en el chip de análisis 2 fue difícil y que el tiempo exigido superó los 5 minutos, por lo que la operatividad se evaluó como "C" (Tabla 1).

Para este chip de análisis 2, se contaron las burbujas generadas en la solución de la sustancia de ensayo después de la reacción de hibridación de la misma manera que en el Ejemplo 1 (7). El número de burbujas promedio calculadas a partir de los resultados obtenidos después de 24 tandas de la reacción fue de 13,0 (Tabla 1).

- 5 Además, de la misma manera que en el Ejemplo 1 (8), se calculó la desviación de los valores de señal de fondo (valor CV), que resultó ser 12,1% (Tabla 1).

Ejemplo comparativo 2

- 10 La evaluación se llevó a cabo de la misma manera que en el Ejemplo 2, salvo que se utilizó el chip de análisis 2 preparado en el Ejemplo Comparativo 1 en vez del clip de análisis 1 con un tratamiento de desgasificación para la solución de la sustancia de ensayo.

- 15 Se contaron las burbujas generadas en la solución de la sustancia de ensayo después de la reacción de hibridación de la misma manera que en el Ejemplo 1 (7). El número promedio obtenido después de 3 tandas de la reacción fue 9,0 (Tabla 1).

- 20 Además, de la misma manera que en el Ejemplo 1 (8), se calculó la desviación de los valores de señal de fondo (valor CV), que resultó ser 10,5% (Tabla 1).

Ejemplo 3

- 25 En el Ejemplo 1 (4) se utilizó desoxicolato de sodio (un tipo de tensioactivo aniónico) como tensioactivo en vez de dodecil sulfato de sodio (SDS) y se inyectaron 120 mg de las partículas sometidas a un tratamiento de revestimiento con el tensioactivo de la misma manera para preparar un "chip de análisis 3". Se llevó a cabo la evaluación utilizando este chip de análisis 3 con un tratamiento de desgasificación de la solución de la misma manera que en el Ejemplo 2.

- 30 El resultado de la evaluación de la operatividad de la inyección de partículas tal como en el Ejemplo 1 (5) mostró que la operatividad de inclusión de las partículas en el chip de análisis 3 se evaluó como "B" ya que el promedio de las tandas exigidas en 10 tandas de la reacción fue de al menos 3 minutos y no más de 5 minutos (Tabla 2).

- 35 Para este chip de análisis 3, se contaron las burbujas generadas en la solución de la sustancia de ensayo después de la reacción de hibridación de la misma manera que en el Ejemplo 1 (7). El número promedio de las burbujas calculadas a partir de los resultados obtenidos en 10 tandas de la reacción fue de 0,6 (Tabla 2).

- 40 Además, de la misma manera que en el Ejemplo 1 (8), se calculó la desviación de los valores de señal de fondo (valor CV), que resultó ser 7,2% (Tabla 1).

Ejemplo 4

- 45 En el Ejemplo 1 (4), se utilizó Pluronic F68 (un tipo de tensioactivo no iónico) como tensioactivo en vez de dodecil sulfato de sodio (SDS) y se utilizaron las partículas sometidas a un tratamiento de revestimiento con el tensioactivo en las siguientes etapas para preparar un "chip de análisis 4". Es decir, después de tratar las partículas hechas de circonio de la misma manera que en el Ejemplo 1 (4), las partículas se lavaron una vez con 400 ml de agua desionizada (agua Milli-Q) y luego se secaron a 70 °C durante 4 horas. Se inyectaron 120 mg de estas partículas al chip de análisis para preparar el chip de análisis 4.

- 50 A partir de los resultados obtenidos después de 10 tandas de evaluación de la operatividad de inyección de las partículas de la misma forma que en el Ejemplo 1 (5), se demostró que el tiempo requerido fue de máximo 3 minutos. Por lo tanto, la operatividad se evaluó como "A" (Tabla 2).

- 55 Se aplicaron 165 µl de la solución de la sustancia de ensayo sometida a un tratamiento de desgasificación de la misma manera que en el Ejemplo 2 al chip de análisis 4 y las reacciones de hibridación se llevaron a cabo de la misma manera que en el Ejemplo 1 (7). Se contó el número de burbujas generado en la solución de la sustancia de ensayo y el número promedio obtenido en 6 tandas de evaluación fue de 1,2 (Tabla 2).

- 60 Además, de la misma manera que en el Ejemplo 1 (8), se calculó la desviación de los valores de señal de fondo (valor CV), que resultó ser 8,4% (Tabla 2).

Ejemplo 5

- 65 En el Ejemplo 1 (4), se utilizó Pluronic F127 (un tipo de tensioactivo no iónico) como tensioactivo en vez de dodecil sulfato de sodio (SDS) y se utilizaron las partículas sometidas a un tratamiento de revestimiento con el tensioactivo en las siguientes etapas para preparar un "chip de análisis 5". Es decir, después de tratar las partículas hechas de circonio de la misma manera que en el Ejemplo 1 (4), las partículas se lavaron una vez con 400 ml de agua

desionizada (agua Milli-Q) y luego se secaron a 70 °C durante 4 horas. Se inyectaron 120 mg de estas partículas al chip de análisis para preparar el chip de análisis 5.

5 A partir de los resultados obtenidos después de 10 tandas de evaluación de la operatividad de inyección de las partículas de la misma forma que en el Ejemplo 1 (5), se demostró que el tiempo requerido fue de máximo 3 minutos. Por lo tanto, la operatividad se evaluó como "A" (Tabla 2).

10 Se aplicaron 165 µl de la solución de la sustancia de ensayo sometida a un tratamiento de desgasificación de la misma manera que en el Ejemplo 2 al chip de análisis 5 y las reacciones de hibridación se llevaron a cabo de la misma manera que en el Ejemplo 1 (7). Se contó el número de burbujas generado en la solución de la sustancia de ensayo y el número promedio obtenido en 6 tandas de evaluación fue de 1,8 (Tabla 2).

15 Además, de la misma manera que en el Ejemplo 1 (8), se calculó la desviación de los valores de señal de fondo (valor CV), que resultó ser 7,6% (Tabla 2).

Ejemplo 6

20 En el Ejemplo 1 (4), se utilizó Triton X-100 (un tipo de tensioactivo no iónico) como tensioactivo en vez de dodecil sulfato de sodio (SDS) y se utilizaron las partículas sometidas a un tratamiento de revestimiento con el tensioactivo en las siguientes etapas para preparar un "chip de análisis 6". Es decir, después de tratar las partículas hechas de circonio de la misma manera que en el Ejemplo 1 (4), las partículas se sometieron a un lavado ultrasónico en 400 ml de agua desionizada (agua Milli-Q) por 30 segundos y luego se secaron a 70 °C durante 4 horas. Se inyectaron 120 mg de estas partículas al chip de análisis para preparar el chip de análisis 6.

25 A partir de los resultados obtenidos después de 10 tandas de evaluación de la operatividad de inyección de las partículas de la misma forma que en el Ejemplo 1 (5), se demostró que el tiempo requerido fue de máximo 3 minutos en 7 chips y al menos 3 minutos y no más de 5 minutos en 3 chips. Por lo tanto, la operatividad se evaluó como "B" (Tabla 2).

30 Se aplicaron 165 µl de la solución de la sustancia de ensayo sometida a un tratamiento de desgasificación de la misma manera que en el Ejemplo 2 al chip de análisis 6 y las reacciones de hibridación se llevaron a cabo de la misma manera que en el Ejemplo 1 (7). Se contó el número de burbujas generado en la solución de la sustancia de ensayo y el número promedio obtenido en 6 tandas de evaluación fue de 2,1 (Tabla 2).

35 Además, de la misma manera que en el Ejemplo 1 (8), se calculó la desviación de los valores de señal de fondo (valor CV), que resultó ser 8,3% (Tabla 2).

Ejemplo 7

40 En el Ejemplo 1 (4), se utilizó Tween 20 (un tipo de tensioactivo no iónico) como tensioactivo en vez de dodecil sulfato de sodio (SDS) y se utilizaron las partículas sometidas a un tratamiento de revestimiento con el tensioactivo en las siguientes etapas para preparar un "chip de análisis 7". Es decir, después de tratar las partículas hechas de circonio de la misma manera que en el Ejemplo 1 (4), las partículas se lavaron una vez con 400 ml de agua desionizada (agua Milli-Q) y luego se secaron a 70 °C durante 4 horas. Se inyectaron 120 mg de estas partículas al chip de análisis para preparar el chip de análisis 7.

45 A partir de los resultados obtenidos después de 10 tandas de evaluación de la operatividad de inyección de las partículas de la misma forma que en el Ejemplo 1 (5), se demostró que el tiempo requerido fue de máximo 3 minutos para 6 chips y de al menos 3 minutos y no más de 5 minutos para 4 chips. Por lo tanto, la operatividad se evaluó como "B" (Tabla 2).

50 Se aplicaron 165 µl de la solución de la sustancia de ensayo sometida a un tratamiento de desgasificación de la misma manera que en el Ejemplo 2 al chip de análisis 7 y las reacciones de hibridación se llevaron a cabo de la misma manera que en el Ejemplo 1 (7). Se contó el número de burbujas generado en la solución de la sustancia de ensayo y el número promedio obtenido en 6 tandas de evaluación fue de 2,2 (Tabla 2).

Además, de la misma manera que en el Ejemplo 1 (8), se calculó la desviación de los valores de señal de fondo (valor CV), que resultó ser 7,0% (Tabla 2).

60 Ejemplo 8

65 En el Ejemplo 1 (4), se utilizó 3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-2-hidroxiopropanosulfonato (CHAPSO; un tipo de tensioactivo anfótero) como tensioactivo en vez de dodecil sulfato de sodio (SDS) y se utilizaron las partículas sometidas a un tratamiento de revestimiento con el tensioactivo en las siguientes etapas para preparar un "chip de análisis 8". Es decir, después de tratar las partículas hechas de circonio de la misma manera que en el Ejemplo 1 (4), las partículas se lavaron una vez con 400 ml de agua desionizada (agua Milli-Q) y luego se secaron a 70 °C

durante 4 horas. Se inyectaron 120 mg de estas partículas al chip de análisis para preparar el chip de análisis 8.

5 A partir de los resultados obtenidos después de 10 tandas de evaluación de la operatividad de inyección de las partículas de la misma forma que en el Ejemplo 1 (5), se demostró que el tiempo requerido fue de máximo 3 minutos para 8 chips y de al menos 3 minutos y no más de 5 minutos para 2 chips. Por lo tanto, la operatividad se evaluó como "B" (Tabla 2).

10 Se aplicaron 165 μl de la solución de la sustancia de ensayo sometida a un tratamiento de desgasificación de la misma manera que en el Ejemplo 2 al chip de análisis 8 y las reacciones de hibridación se llevaron a cabo de la misma manera que en el Ejemplo 1 (7). Se contó el número de burbujas generado en la solución de la sustancia de ensayo y el número promedio obtenido en 6 tandas de evaluación fue de 2,5 (Tabla 2).

15 Además, de la misma manera que en el Ejemplo 1 (8), se calculó la desviación de los valores de señal de fondo (valor CV), que resultó ser 7,6% (Tabla 2).

Ejemplo 9

20 En el Ejemplo 1 (4), se utilizó bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB; un tipo de tensioactivo catiónico) como tensioactivo en vez de dodecil sulfato de sodio (SDS) y se utilizaron las partículas sometidas a un tratamiento de revestimiento con el tensioactivo en las siguientes etapas para preparar un "chip de análisis 9". Es decir, después de tratar las partículas hechas de circonio de la misma manera que en el Ejemplo 1 (4), las partículas se lavaron una vez con 400 ml de agua desionizada (agua Milli-Q) y luego se secaron a 70 °C durante 4 horas. Se inyectaron 120 mg de estas partículas al chip de análisis para preparar el chip de análisis 9.

25 A partir de los resultados obtenidos después de 10 tandas de evaluación de la operatividad de inyección de las partículas de la misma forma que en el Ejemplo 1 (5), se demostró que el tiempo requerido fue de máximo 3 minutos para 7 chips y de al menos 3 minutos y no más de 5 minutos para 3 chips. Por lo tanto, la operatividad se evaluó como "B" (Tabla 2).

30 Se aplicaron 165 μl de la solución de la sustancia de ensayo sometida a un tratamiento de desgasificación de la misma manera que en el Ejemplo 2 al chip de análisis 9 y las reacciones de hibridación se llevaron a cabo de la misma manera que en el Ejemplo 1 (7). Se contó el número de burbujas generado en la solución de la sustancia de ensayo y el número promedio obtenido en 6 tandas de evaluación fue de 3,0 (Tabla 2).

35 Además, de la misma manera que en el Ejemplo 1 (8), se calculó la desviación de los valores de señal de fondo (valor CV), que resultó ser 7,9% (Tabla 2).

Ejemplo 10

40 En el Ejemplo 1 (1), se utilizó el "sustrato B", un sustrato que tiene solo una porción empotrada con dimensiones de una longitud longitudinal de 39,4 mm, una longitud lateral de 19,0 mm y una profundidad de 0,05 mm (con la misma forma que el ejemplificado en la Fig. 3 y Fig. 4, excepto que no cuenta con las porciones sobresalientes 11) como el sustrato del chip de análisis en vez del sustrato A. Se llevó a cabo la inmovilización de las sustancias de fijación selectiva del Ejemplo 1 (2) al colocar 9248 puntos con los mismos intervalos que aquellos del sustrato A para formar un rectángulo con dimensiones de longitud longitudinal de 39,4 mm y una longitud lateral de 19,0 mm en la superficie inferior de la porción empotrada.

50 Se preparó por corte y se utilizó una placa plana PMMA con dimensiones de una longitud longitudinal de 41,4 mm, una longitud lateral de 21 mm y un grosor de 1 mm como elemento de cubierta del Ejemplo 1 (3). Se proporcionaron los agujeros penetrantes y las cámaras de detención de nivel de líquido en el elemento de cubierta preparado tal como se ejemplifican en 32 y 33 en la Fig. 7. Se utilizó una cinta doble adhesiva de 1 mm de grosor como elemento adhesivo y se unió a lo largo del borde longitudinal de 41,4 mm y del borde lateral de 21 mm de tal forma que la cinta se laminó a un grosor de 50 μm para unir el elemento de cubierta al sustrato B.

55 Excepto los anteriores, con las mismas etapas que aquellas descritas en (1)-(4) en el Ejemplo 1, se preparó el "chip de análisis 10", al que se le inyectaron 120 mg de partículas hechas de circonio revestidas por dodecil sulfato de sodio (SDS) como tensioactivo.

60 A partir de los resultados obtenidos después de 10 tandas de evaluación de la operatividad de inyección de las partículas de la misma forma que en el Ejemplo 1 (5), se demostró que el tiempo requerido fue al menos 3 minutos y no más de 5 minutos. Por lo tanto, la operatividad se evaluó como "B" (Tabla 3).

65 Se aplicaron 165 μl de la solución de la sustancia de ensayo sometida a un tratamiento de desgasificación de la misma manera que en el Ejemplo 2 al chip de análisis 10 y las reacciones de hibridación se llevaron a cabo de la misma manera que en el Ejemplo 1 (7). Se contó el número de burbujas generado en la solución de la sustancia de ensayo y el número promedio obtenido en 6 tandas de evaluación fue de 0,5 (Tabla 3).

Además, de la misma manera que en el Ejemplo 1 (8), se calculó la desviación de los valores de señal de fondo (valor CV), que resultó ser 9,5% (Tabla 3).

Ejemplo 11

En el Ejemplo 1 (1), se utilizó el "sustrato C", una placa plana que no tiene ni porción empotrada ni porción sobresaliente (con la misma forma que la ejemplificada en la Fig. 3 y Fig. 4, excepto que no cuenta con la porción empotrada 10 ni la porción sobresaliente 11) como el sustrato del chip de análisis en vez del sustrato A. Se llevó a cabo la inmovilización de las sustancias de fijación selectiva del Ejemplo 1 (2) al colocar 9248 puntos con los mismos intervalos que aquellos del sustrato A para formar un rectángulo con dimensiones de longitud longitudinal de 39,4 mm y una longitud lateral de 19,0 mm en la superficie superior plana del sustrato C.

Se preparó por corte y se utilizó una placa plana PMMA con dimensiones de una longitud longitudinal de 41,4 mm, una longitud lateral de 21 mm y un grosor de 1 mm como elemento de cubierta del Ejemplo 1 (3). Se proporcionaron los agujeros penetrantes y las cámaras de detención de nivel de líquido en el elemento de cubierta preparado tal como se ejemplifican en 32 y 33 en la Fig. 7. Se utilizó una cinta doble adhesiva de 1 mm de grosor como elemento adhesivo y se unió a lo largo del borde longitudinal de 41,4 mm y el borde lateral de 21 mm de tal forma que la cinta se laminó a un grosor de 200 μm para unir el elemento de cubierta al sustrato C.

Excepto los anteriores, con las mismas etapas que aquellas descritas en (1)-(4) en el Ejemplo 1, se preparó el "chip de análisis 11", al que se le inyectaron 120 mg de partículas hechas de circonio revestidas por dodecil sulfato de sodio (SDS) como tensioactivo.

A partir de los resultados obtenidos después de 10 tandas de evaluación de la operatividad de inyección de las partículas de la misma forma que en el Ejemplo 1 (5), se demostró que el tiempo requerido fue de máximo 3 minutos para 7 chip y al menos 3 minutos y no más de 5 minutos para 3 chips. Por lo tanto, la operatividad se evaluó como "B" (Tabla 3).

Se aplicaron 165 μl de la solución de la sustancia de ensayo sometida a un tratamiento de desgasificación de la misma manera que en el Ejemplo 2 al chip de análisis 11 y las reacciones de hibridación se llevaron a cabo de la misma manera que en el Ejemplo 1 (7). Se contó el número de burbujas generado en la solución de la sustancia de ensayo y el número promedio obtenido en 6 tandas de evaluación fue de 0,6 (Tabla 3).

Además, de la misma manera que en el Ejemplo 1 (8), se calculó la desviación de los valores de señal de fondo (valor CV), que resultó ser 9,3% (Tabla 3).

Ejemplo 12

En el Ejemplo 1 (4), se utilizaron partículas hechas de hierro con un diámetro de 200 μm (producidas por Sanshokenmazai Co., Ltd.) como las partículas en vez de las partículas hechas de circonio con un diámetro de 180 μm y se inyectaron 120 mg de las partículas sometidas a un tratamiento de revestimiento con dodecil sulfato de sodio (SDS) como tensioactivo de la misma manera que en el Ejemplo 1 (4) para preparar un "chip de análisis 12".

A partir de los resultados obtenidos después de 10 tandas de evaluación de la operatividad de inyección de las partículas de la misma forma que en el Ejemplo 1 (5), se demostró que el tiempo requerido fue de al menos 3 minutos y no más de 5 minutos. Por lo tanto, la operatividad se evaluó como "B" (Tabla 3).

Se aplicó la solución de la sustancia de ensayo sometida a un tratamiento de desgasificación de la misma manera que en el Ejemplo 2 al chip de análisis 12 y las reacciones de hibridación se llevaron a cabo de la misma manera que en el Ejemplo 1 (7). Se contó el número de burbujas generado en la solución de la sustancia de ensayo y el número promedio obtenido en 6 tandas de evaluación fue de 2,2 (Tabla 3).

Además, de la misma manera que en el Ejemplo 1 (8), se calculó la desviación de los valores de señal de fondo (valor CV), que resultó ser 8,0% (Tabla 3).

Ejemplo Comparativo 3

Se preparó un chip de la misma manera que en el Ejemplo 12 excepto que las partículas hechas de hierro con un diámetro de 200 μm se utilizaron tal cual como las partículas para preparar un "chip de análisis 13". Se llevó a cabo la evaluación de la misma manera que en el Ejemplo 1 utilizando este chip de análisis 13.

A partir de los resultados obtenidos después de 10 tandas de evaluación de la operatividad de inyección de las partículas de la misma forma que en el Ejemplo 1 (5), se demostró que la operación fue difícil y que se demoró más de 5 minutos. Por lo tanto la operatividad se evaluó como "C" (Tabla 3).

Se aplicó la solución de la sustancia de ensayo sometida a un tratamiento de desgasificación de la misma manera

que en el Ejemplo 2 al chip de análisis 13 y las reacciones de hibridación se llevaron a cabo de la misma manera que en el Ejemplo 1 (7). Se contó el número de burbujas generado en la solución de la sustancia de ensayo y el número promedio obtenido en 6 tandas de evaluación fue de 10,0 (Tabla 3).

5 Además, de la misma manera que en el Ejemplo 1 (8), se calculó la desviación de los valores de señal de fondo (valor CV), que resultó ser 13,3% (Tabla 3).

Ejemplo 13

10 En el Ejemplo 1 (4), se utilizaron partículas hechas de vidrio con un diámetro de 200 μm (producidas por Bio Medical Science Inc.) como las partículas en vez de las partículas hechas de circonio con un diámetro de 180 μm y se inyectaron 120 mg de las partículas sometidas a un tratamiento de revestimiento con dodecil sulfato de sodio (SDS) como tensioactivo de la misma manera que en el Ejemplo 1 (4) para preparar un "chip de análisis 14".

15 A partir de los resultados obtenidos después de 10 tandas de evaluación de la operatividad de inyección de las partículas de la misma forma que en el Ejemplo 1 (5), se demostró que el tiempo requerido fue de al menos 3 minutos y no más de 5 minutos. Por lo tanto, la operatividad se evaluó como "B" (Tabla 3).

20 Se aplicó la solución de la sustancia de ensayo sometida a un tratamiento de desgasificación de la misma manera que en el Ejemplo 2 al chip de análisis 14 y las reacciones de hibridación se llevaron a cabo de la misma manera que en el Ejemplo 1 (7). Se contó el número de burbujas generado en la solución de la sustancia de ensayo y el número promedio obtenido en 6 tandas de evaluación fue de 1,0 (Tabla 3).

25 Además, de la misma manera que en el Ejemplo 1 (8), se calculó la desviación de los valores de señal de fondo (valor CV), que resultó ser 8,2% (Tabla 3).

Ejemplo Comparativo 4

30 Se preparó un chip de la misma manera que en el Ejemplo 13 excepto que las partículas hechas de vidrio con un diámetro de 200 μm se utilizaron tal cual sin el tratamiento de revestimiento con el tensioactivo como las partículas (Ejemplo 1 (4)) para preparar un "chip de análisis 15". Se llevó a cabo la evaluación de la misma manera que en el Ejemplo 1 utilizando este chip de análisis 15.

35 A partir de los resultados obtenidos después de 10 tandas de evaluación de la operatividad de inyección de las partículas de la misma forma que en el Ejemplo 1 (5), se demostró que la operación fue difícil y que se demoró más de 5 minutos. Por lo tanto la operatividad se evaluó como "C" (Tabla 3).

40 Se aplicó la solución de la sustancia de ensayo sometida a un tratamiento de desgasificación de la misma manera que en el Ejemplo 2 al chip de análisis 15 y las reacciones de hibridación se llevaron a cabo de la misma manera que en el Ejemplo 1 (7). Se contó el número de burbujas generado en la solución de la sustancia de ensayo y el número promedio obtenido en 6 tandas de evaluación fue de 8,8 (Tabla 3).

45 Además, de la misma manera que en el Ejemplo 1 (5), se calculó la desviación de los valores de señal de fondo (valor CV), que resultó ser 12,9% (Tabla 3).

[Tabla 1]

	Ejemplo 1	Ejemplo 2	Ejemplo Comparativo 1	Ejemplo Comparativo 2
Número de chip de análisis Sustrato	1 Sustrato A	1 Sustrato A	2 Sustrato A	2 Sustrato A
Tratamiento con tensioactivo	Sí	Sí	No	No
Tensioactivo	SDS	SDS	-	-
Tratamiento de desgasificación	No	Sí	No	Sí
Material de las partículas	Circonio	Circonio	Circonio	Circonio
Operatividad de	A	A	C	C

ES 2 384 745 T3

inyección de partículas				
Número promedio de burbujas generadas	4,5	0,4	13,0	9,0
Valor CV (%) de señales de fondo	8,4	6,7	12,1	10,5

[Tabla 2]

	Ejemplo 3	Ejemplo 4	Ejemplo 5	Ejemplo 6	Ejemplo 7	Ejemplo 8	Ejemplo 9
Número de chip de análisis Sustrato	3 Sustrato A	4 Sustrato A	5 Sustrato A	6 Sustrato A	7 Sustrato A	8 Sustrato A	9 Sustrato A
Tratamiento con tensioactivo	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
Tensioactivo	Desoxicolato de Sodio	Pluronic F68	Pluronic F127	Triton X-100	Tween 20	CHAPSO	CTAB
Tratamiento de desgasificación	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
Material de las partículas	Circonio	Circonio	Circonio	Circonio	Circonio	Circonio	Circonio
Operatividad de inyección de partículas	B	A	A	B	B	B	B
Número promedio de burbujas generadas	0,6	1,2	1,8	2,1	2,2	2,5	3,0
Valor CV (%) de señales de fondo	7,2	8,4	7,6	8,3	7,0	7,6	7,9

[Tabla 3]

	Ejemplo 10	Ejemplo 11	Ejemplo 12	Ejemplo Comparativo 3	Ejemplo 13	Ejemplo Comparativo 4
Número de chip de análisis Sustrato	10 Sustrato B	11 Sustrato C	12 Sustrato A	13 Sustrato A	14 Sustrato A	15 Sustrato A
Tratamiento con tensioactivo	Sí	Sí	Sí	No	Sí	No
Tensioactivo	SDS	SDS	SDS	-	SDS	-
Tratamiento de desgasificación	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí

Material de las partículas	Circonio	Circonio	Hierro	Hierro	Vidrio	Vidrio
Operatividad de inyección de partículas	B	B	B	C	B	C
Número promedio de burbujas generadas	0,5	0,6	2,2	10,0	1,0	8,8
Valor CV (%) de señales de fondo	9,5	9,3	8,0	13,3	8,2	12,9

5 A partir de los resultados en los Ejemplos 1-3 y Ejemplos Comparativos 1-4 anteriores, se reveló que la generación de burbujas se suprime al revestir la superficie de las partículas con un tensioactivo, de tal forma que puede reducirse la desviación de datos (valor CV de las señales de fondo) y puede mejorarse la operatividad de la inyección de las partículas en el chip de análisis y la generación de burbujas puede suprimirse de forma más efectiva cuando se lleva a cabo un tratamiento de desgasificación de la solución de la sustancia de ensayo junto con dicho revestimiento.

10 APLICABILIDAD INDUSTRIAL

15 La presente invención suprime la desviación de las sensibilidades de detección y permite la detección de una sustancia de ensayo de alta sensibilidad en un chip de análisis con un sustrato en el que se inmoviliza(n) una(s) sustancia(s) de fijación selectiva capaz(ces) de fijarse de forma selectiva a la sustancia de ensayo, en la que la solución de la sustancia de ensayo puede agitarse con partículas. El chip de análisis proporcionado en esta invención es útil como un chip de análisis para la detección de diversas sustancias biológicamente relevantes en los campos de la medicina y la salud y también como un chip de análisis para la detección de sustancias residuales en los campos de alimentos y el medio ambiente.

REIVINDICACIONES

1. Un chip de análisis que comprende:

5 un sustrato que tiene una superficie en la que se inmoviliza(n) una(s) sustancia(s) de fijación selectiva;
un elemento de cubierta adherido a dicho sustrato;
un hueco entre dicho sustrato y dicho elemento de cubierta; y
partículas contenidas o inyectadas de forma movable en dicho hueco;
10 estando las superficies de dichas partículas revestidas con un/unos tensioactivo(s).

2. El chip de análisis de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho tensioactivo revestido sobre dichas superficies de dichas partículas es un tensioactivo aniónico o un tensioactivo no iónico.

15 3. El chip de análisis de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que dicho sustrato comprende una región irregular compuesta por porciones empotradas y porciones sobresalientes y dicha(s) sustancia(s) de fijación selectiva se inmoviliza(n) en las superficies superiores de dichas porciones sobresalientes.

20 4. El chip de análisis de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el material que constituye dichas partículas revestidas con dicho(s) tensioactivo(s) comprende una cerámica.

5. El chip de análisis de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en el que uno o más agujeros penetrantes que se comunican con dicho hueco se forman en dicho elemento de cubierta.

25 6. El chip de análisis de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la distancia más corta entre dicha superficie de dicho sustrato en el que se inmoviliza(n) dicha(s) sustancia(s) de fijación selectiva y dicho elemento de cubierta es menor que el diámetro de dichas partículas.

30 7. El chip de análisis de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicha sustancia de fijación selectiva es un ADN, ARN, proteína, péptido, sacárido, cadena de azúcar o lípido.

8. Un método para analizar una sustancia de ensayo, dicho método comprendiendo las etapas de:

35 poner en contacto dicho chip de análisis de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en contacto con una solución que contiene una sustancia de ensayo, fijando de esa manera dicha sustancia de ensayo a dicha sustancia de fijación selectiva inmovilizada en la superficie de dicho sustrato; y
medir la cantidad de dicha sustancia fijada a dicho chip de análisis a través de dicha sustancia de fijación selectiva.

40 9. El método para analizar una sustancia de ensayo de acuerdo con la reivindicación 8, en el que dicha solución que contiene dicha sustancia de ensayo se somete a un tratamiento de desgasificación antes de poner a dicha solución que contiene la sustancia de ensayo en contacto con dicho chip de análisis.

Fig. 1

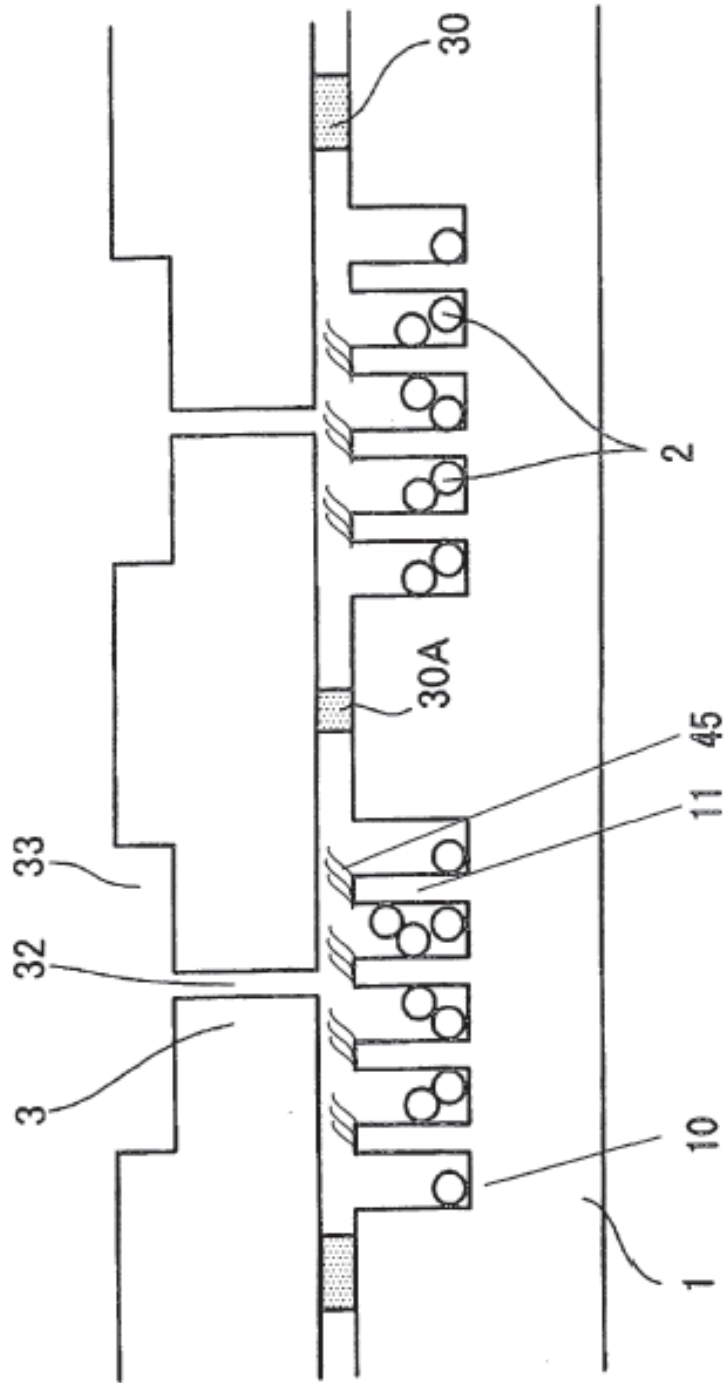


Fig. 2

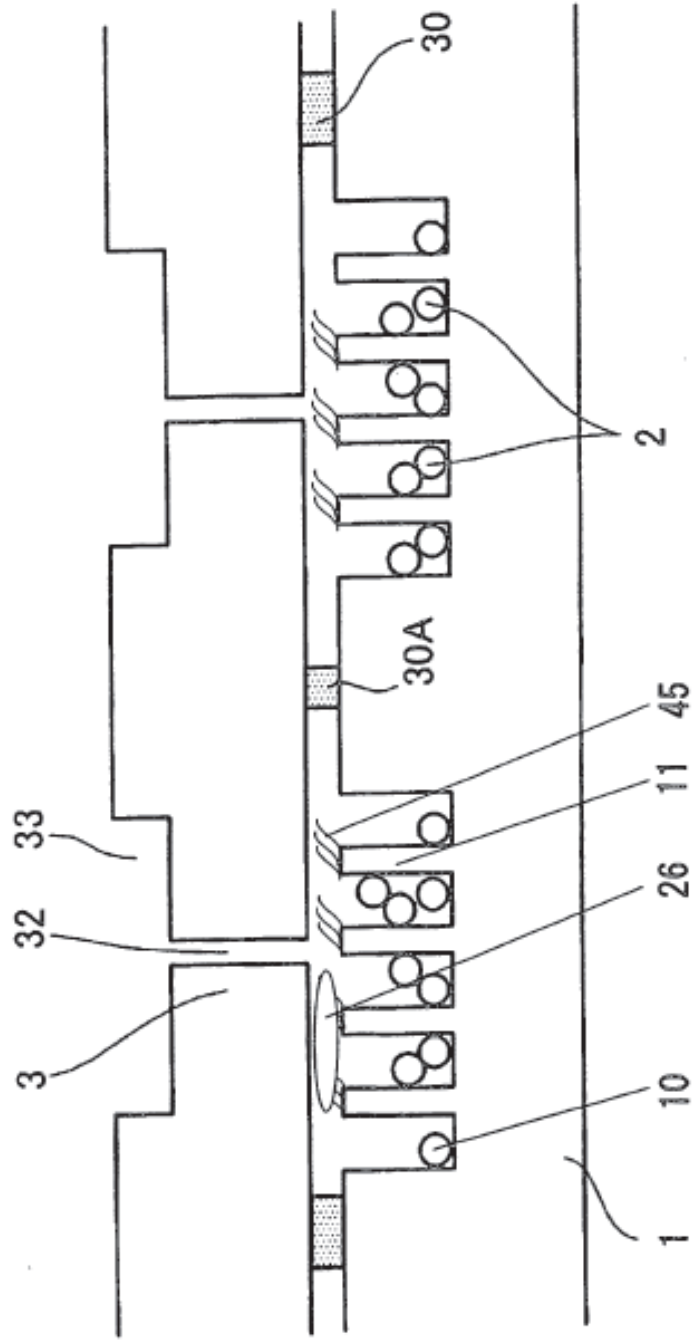
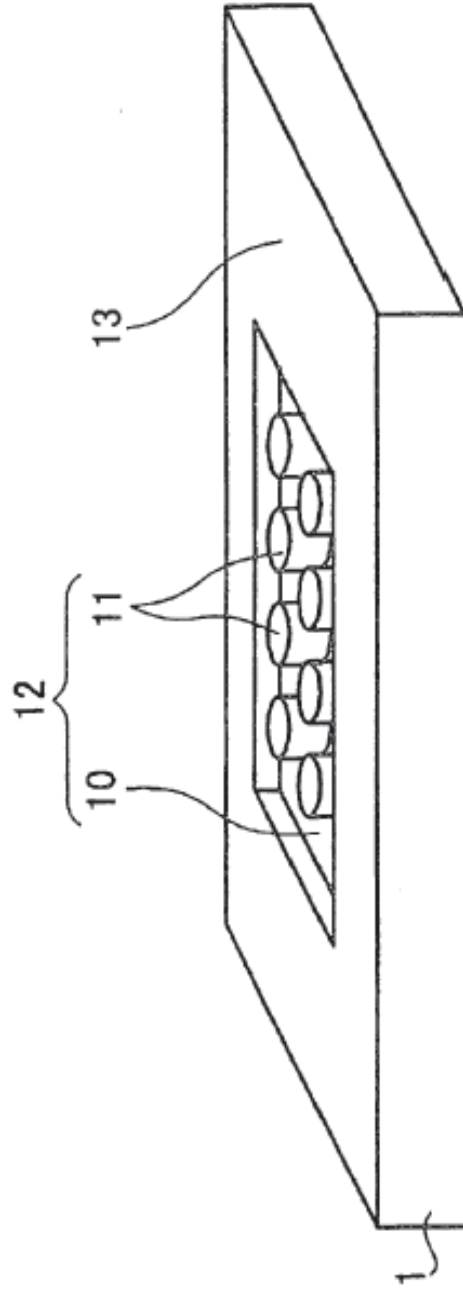


Fig. 3



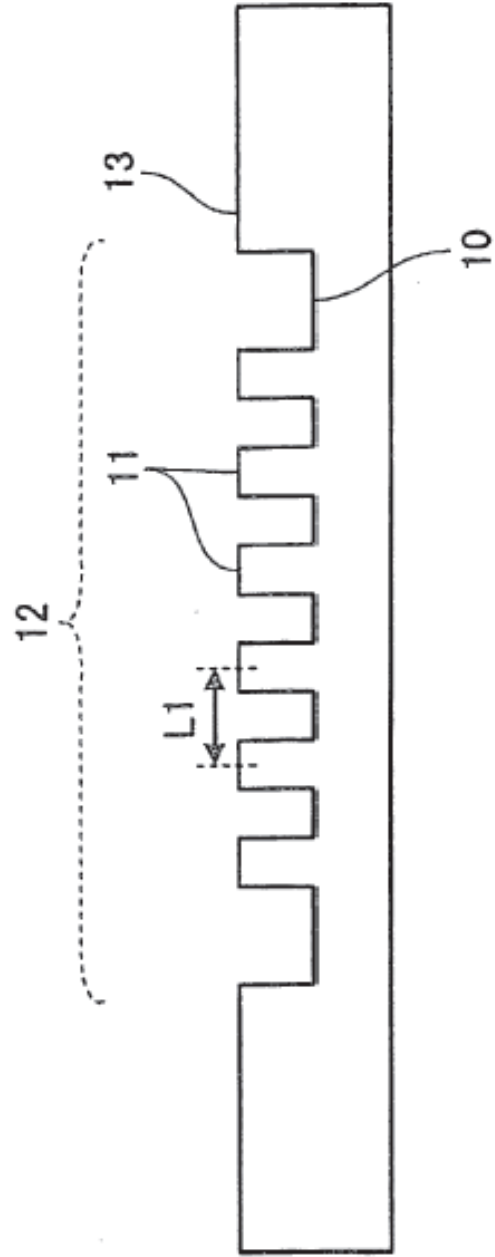
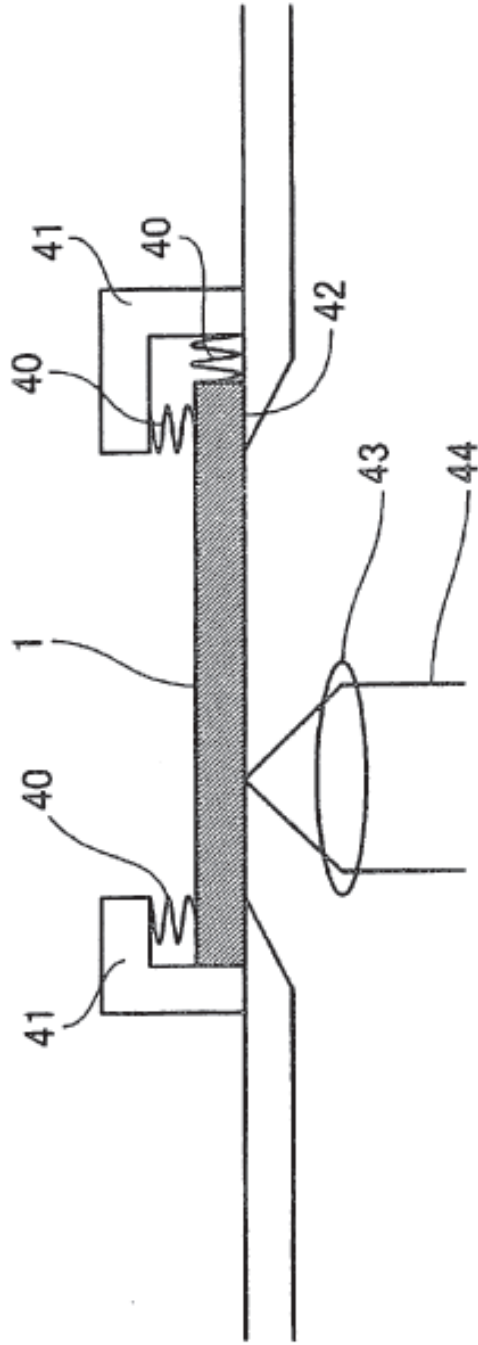


Fig. 4

Fig. 5



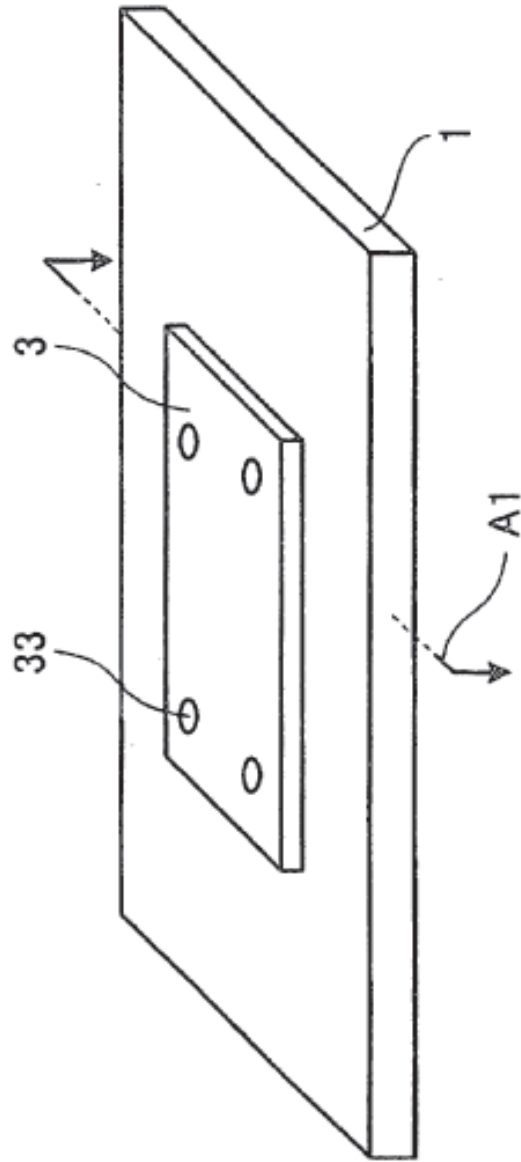


Fig. 6

Fig. 7

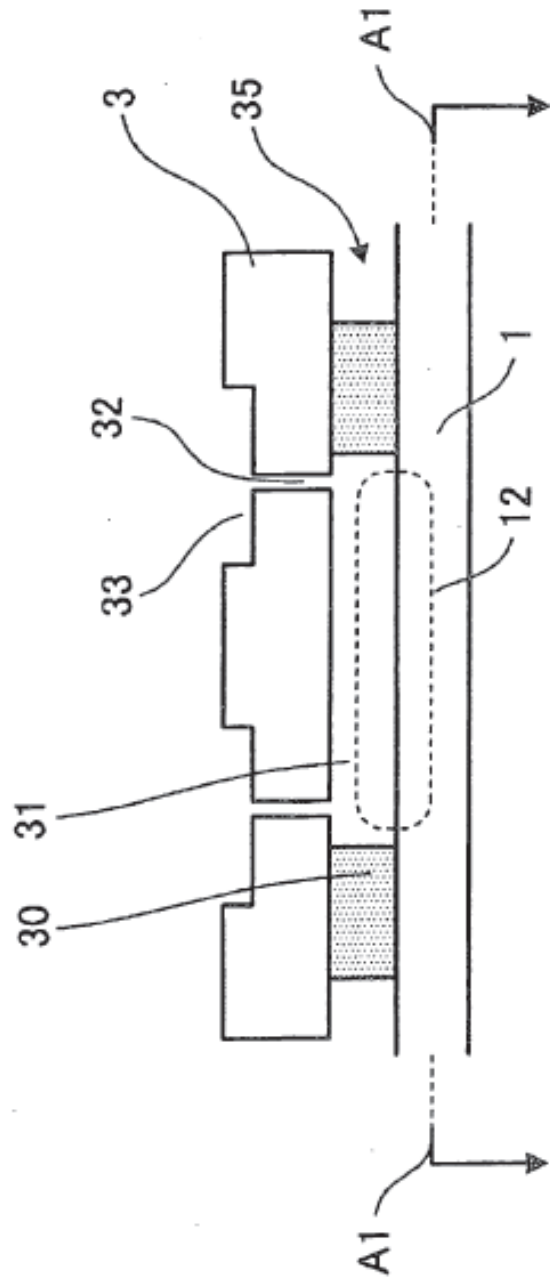


Fig. 8

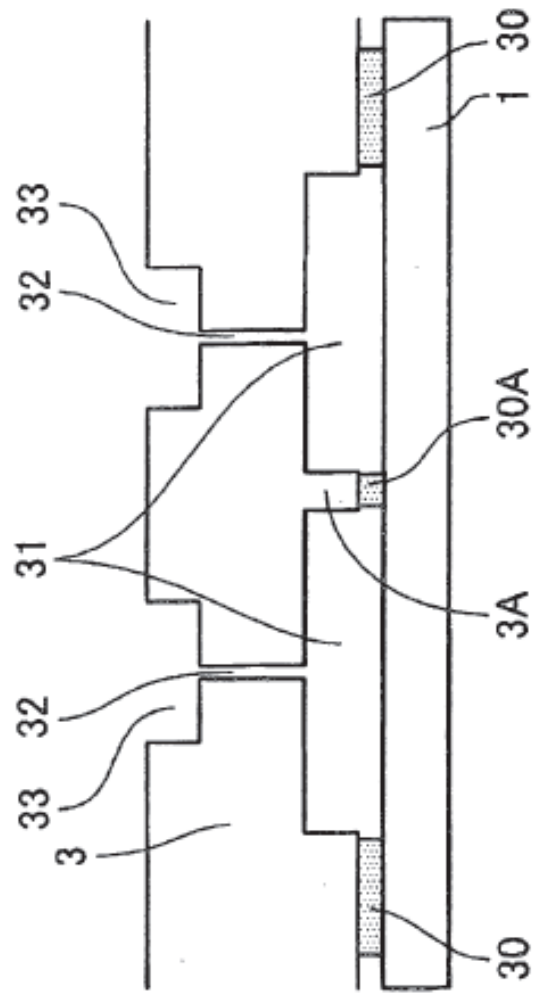
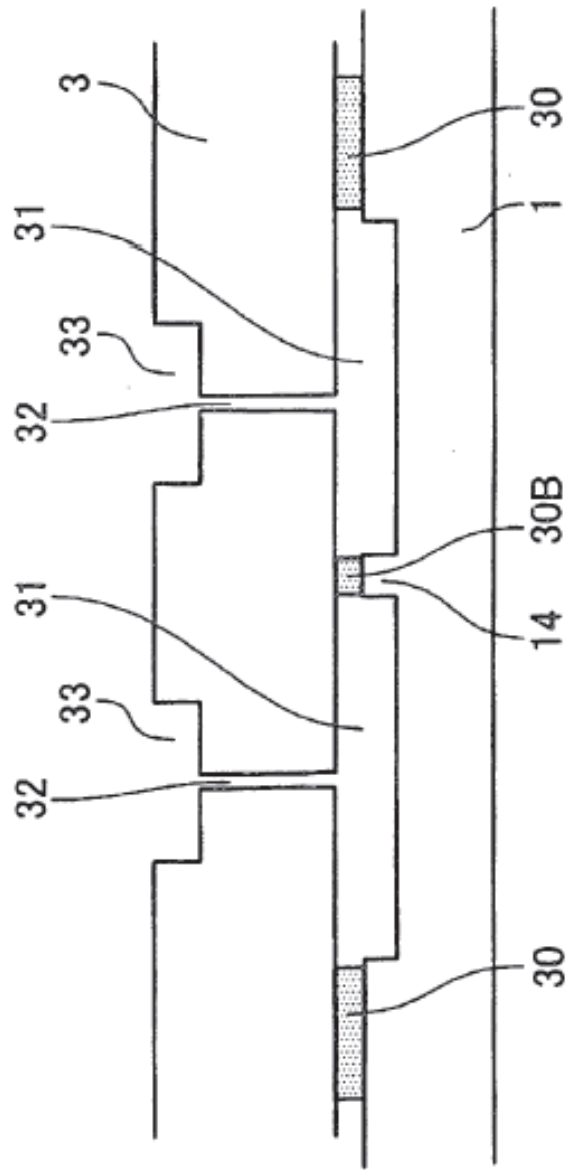


Fig. 9



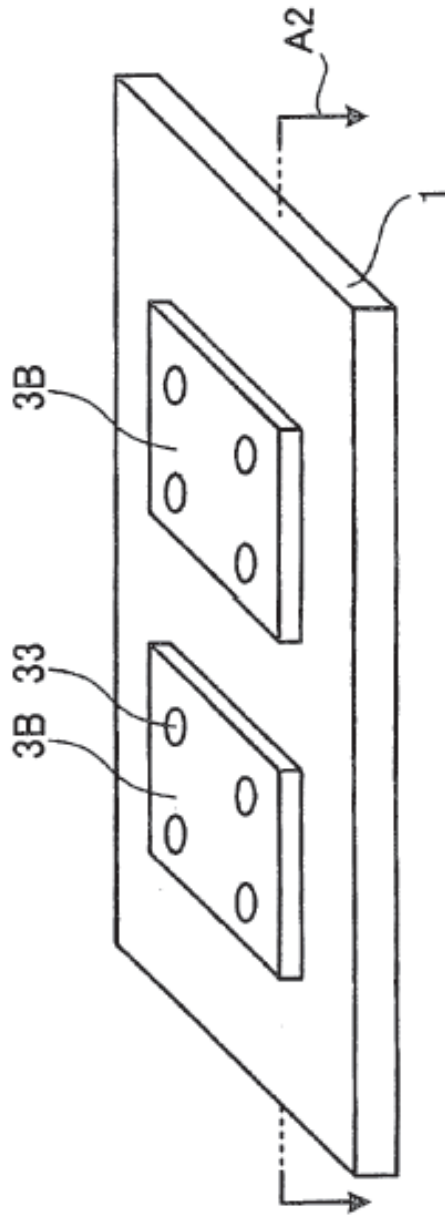
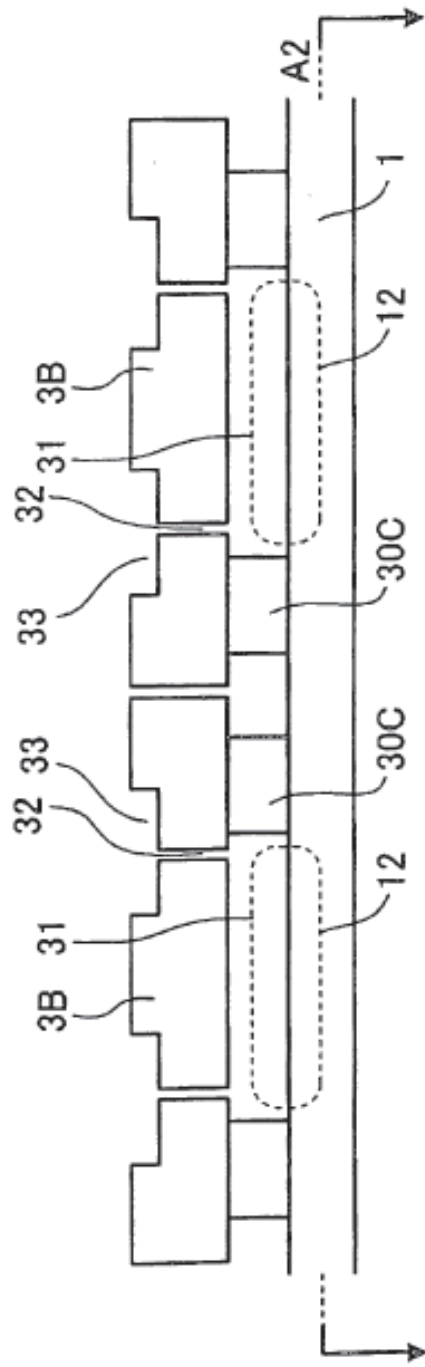


Fig. 10

Fig. 11



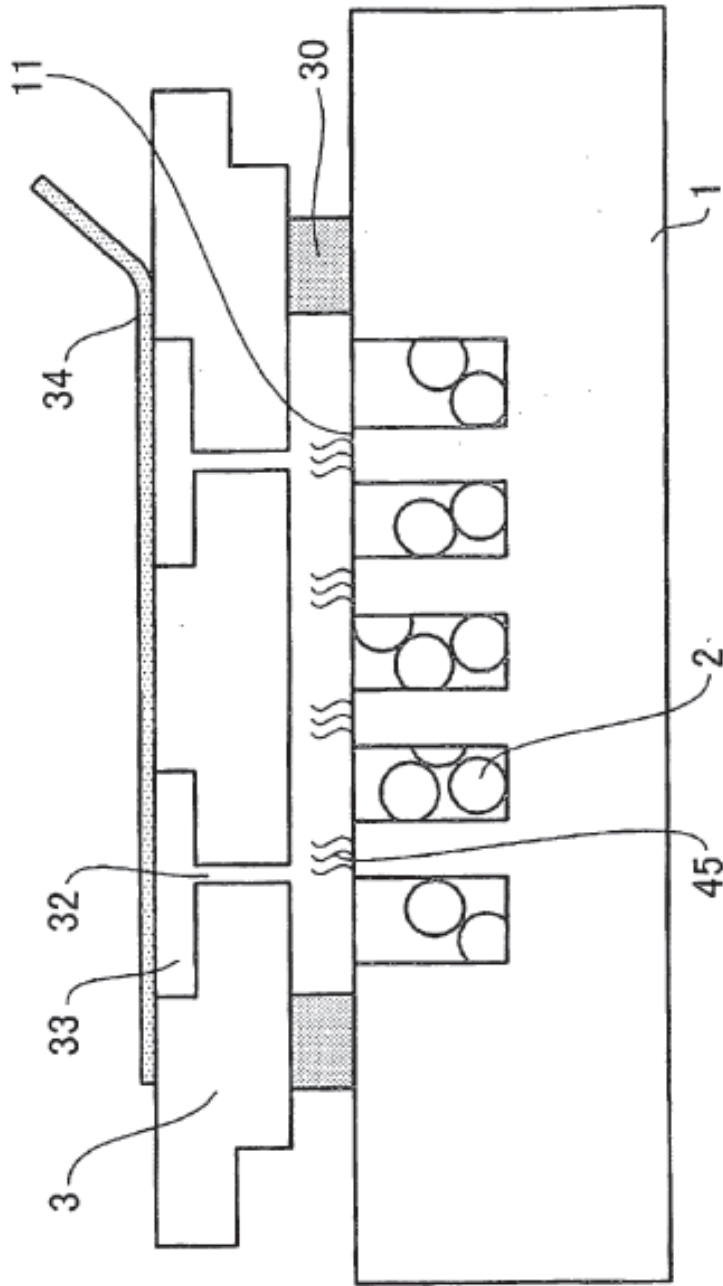


Fig. 12