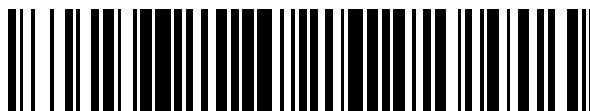


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 388 005**

51 Int. Cl.:  
**G01N 27/447** (2006.01)  
**G01N 21/64** (2006.01)  
**G01N 33/58** (2006.01)  
**G01N 1/28** (2006.01)  
**G01N 33/53** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07868154 .1**  
96 Fecha de presentación: **27.12.2007**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2100138**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **16.09.2009**

54 Título: **Procedimiento de normalización interna de ensayos**

30 Prioridad:  
**28.12.2006 US 882514 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**05.10.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**05.10.2012**

73 Titular/es:  
**WAKO PURE CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.  
1-2, DOSHOMACHI 3-CHOME CHUO-KU  
OSAKA-SHI OSAKA 540-8605, JP**

72 Inventor/es:  
**WADA, Henry G.;  
KAWABATA, Tomohisa y  
BOUSSE, Luc**

74 Agente/Representante:  
**Carpintero López, Mario**

ES 2 388 005 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

Procedimiento de normalización interna de ensayos

### **Campo de la invención**

5 La presente invención versa acerca de un procedimiento para una estandarización de ensayos y acerca de un sistema del mismo.

### **Antecedentes de la invención**

10 Puede usarse un estándar interno tal como un ADN marcado de forma fluorescente como un estándar interno para alinear picos en ensayos electroforéticos y también como un marcador de referencia cuantitativa para normalizar la señal de pico de los picos de analitos marcados de forma fluorescente. La intensidad del pico del analito es la señal usada para cuantificar la concentración del analito en las muestras sometidas a ensayo. Si hay fluctuaciones en el sistema de ensayo que afecten al volumen de la muestra inyectada o a la sensibilidad de la detección de la marca, tal como la fluctuación en la intensidad de luz láser de excitación, en el enfoque óptico, etc., la señal del analito se verá afectada, causando un error en la medición de la concentración del analito. Normalizando la señal con un estándar interno, puede ser controlada en cuanto a fluctuaciones del sistema en la sensibilidad de detección, error en el volumen de la muestra y en variaciones del chip, tales como una variación del volumen de detección debida a una variación en la profundidad del canal del chip.

15 Se conocen, por ejemplo, a partir del documento WO 02/052038 procedimientos de normalización que se valen de la medición de una señal óptica por una sustancia conocida usada como estándar interno. El problema de un estándar interno es que está contenido en el mismo tampón u otro reactivo y estaría sujeto a variación, debido, por ejemplo, a la evaporación o la condensación, que aumentarán o disminuirán su concentración cuando esté guardado en un sistema previsto para una operación continua durante días, semanas o incluso meses. Cambiar el tampón de muestra todos los días podría ser una solución, pero resultaría inconveniente y caro para el usuario. Otra posible solución es contar con un calibrador externo que se utilice como una muestra. Esto puede ser usado para calibrar el sistema y ajustar la curva de respuesta de concentración, pero no controla cada ensayo en cuanto a la variación del chip individual o a la variación del ensayo individual.

### **Resumen de la invención**

20 El sistema de ensayos aborda el problema del uso de un estándar interno para sistemas tales como sistemas de ensayo electroforético microfluídico. Con el sistema, puede controlarse la variación de la concentración estándar interna debida a factores tales como la evaporación, la condensación o incluso el acarreo de sondas de la solución de lavado de sondas. El sistema puede usar la conductividad del tampón a partir del momento en que el reactivo está fresco para corregir la calibración estándar interna de la señal del analito. Las sales tampón son las principales aportadoras a la conductividad del tampón, y la concentración de estas sales por evaporación o su disolución por condensación o acarreo de sondas cambiarán la conductividad de la solución tampón. Por lo tanto, la medición de la conductividad del tampón en el chip antes de iniciar el ensayo permitirá la medición del nivel de evaporación de los reactivos usados para llenar el chip, incluyendo el tampón de muestra. Cuando no resulte posible medir directamente la conductividad del tampón de muestra debido a la disposición de los electrodos en los canales del chip, puede medirse el nivel de evaporación de uno de los componentes reactivos y explorar el efecto de la evaporación al tampón de muestra y al estándar interno.

30 Puede usarse la misma medición de cambio de la conductancia como una medida de la geometría del chip, porque la conductancia medida es una función de la conductividad del tampón, de la longitud del canal y del área del corte transversal. Una variable dominante para la geometría del canal para los chips producidos por procedimientos fotolitográficos o moldeo de materiales termoplásticos puede estar en la dimensión de la profundidad. Referenciando la conductancia a las mediciones iniciales de chips nuevos en el instrumento a un chip de referencia en el instrumento, será posible normalizar las señales del ensayo para corregir la geometría del chip, que afecta la intensidad de la señal, que es predominante la longitud y la profundidad del canal del chip, de las cuales la profundidad puede ser la variable predominante.

35 Así, las mediciones de la conductancia son un parámetro valioso cuando se usan en ensayos electroforéticos microfluídicos y pueden mejorar la precisión y la reproducibilidad de estos ensayos.

40 Según la invención, también se presenta un procedimiento de normalización para un sistema de ensayos que incluye proporcionar dentro del sistema de ensayo un tampón que incluye una solución estándar interna; obtener una medición de la conductancia eléctrica del tampón antes de comienzo del ensayo; obtener un cambio de la concentración del tampón con base en la medición de la conductancia eléctrica; determinar la concentración de la solución estándar interna con base en el cambio de concentración del tampón para la normalización de los resultados de los ensayos.

5 Se proporciona el tampón del procedimiento para el estándar interno y puede incluir una pluralidad de constituyentes, uno de los cuales es la solución estándar interna. La conductancia eléctrica del tampón es una medición de la conductancia eléctrica total de la pluralidad de constituyentes. La concentración de la solución estándar interna puede ser obtenida extrapolando el cambio de concentración del tampón. La conductancia eléctrica del tampón es aproximadamente proporcional a la concentración de sales o iones en el tampón.

Pueden obtenerse una concentración inicial del tampón y una correspondiente medición de la conductancia eléctrica del tampón antes de obtener la medición de la conductividad eléctrica previa al comienzo de un ensayo.

10 El sistema descrito en el procedimiento puede ser un sistema de ensayo electroforético microfluídico, en el que los resultados del ensayo pueden ser normalizados con base en una señal estándar interna fluorescente y en la concentración de la solución estándar interna.

15 La invención es, además, un procedimiento de normalización para un sistema de ensayos que incluye las etapas de proporcionar dentro del sistema de ensayo una pluralidad de constituyentes del tampón, uno de los cuales incluye una solución estándar interna; obtener una medición de la conductancia eléctrica de la pluralidad de constituyentes del tampón antes de iniciar un ensayo; obtener un cambio de concentración de sales o iones dentro de la pluralidad de constituyentes del tampón con base en la medición de la conductancia eléctrica; y determinar una concentración de la solución estándar interna con base en el cambio de concentración de sales o iones para normalizar los resultados del ensayo.

20 La invención está relacionada, además, con un procedimiento de normalización para un sistema de ensayos que incluye proporcionar dentro del sistema de ensayo un tampón que incluye una solución estándar interna; obtener una medición de la conductancia eléctrica del tampón antes de iniciar un ensayo; y normalizar los resultados del ensayo con base en la medición de la conductancia eléctrica.

El procedimiento puede incluir, además, las etapas de obtener un cambio de concentración del tampón con base en la medición de la conductancia eléctrica; y determinar la concentración de la solución estándar interna con base en el cambio de concentración del tampón para normalizar los resultados del ensayo.

25 El procedimiento puede incluir, además, las etapas de comparar la medición de la conductancia eléctrica con datos predeterminados; y normalizar los resultados del ensayo con base en la comparación.

Debe entenderse que tanto la anterior descripción general como la siguiente descripción detallada son únicamente ejemplares y explicativas y no son restrictivas de la invención, tal como se reivindica.

30 Los dibujos adjuntos, que se incorporan en esta memoria y constituyen parte de la misma, ilustran realizaciones de la invención y, junto con la descripción, sirven para explicar los principios de la invención.

### **Breve descripción de los dibujos**

La Figura 1A es un ejemplo de una relación entre la conductividad y la concentración de NaCl.

La Figura 1B es un ejemplo de una relación entre la conductividad y la concentración estándar interna.

35 La Figura 2A muestra un gráfico ejemplar de datos en términos de la conductividad en función de la concentración de NaCl.

La Figura 2B muestra un gráfico ejemplar de datos en términos de la conductividad en función de la concentración del EI de HyLyte.

La Figura 3A es un ejemplo de un dispositivo con pocillos que están conectados con microcanales.

40 La Figura 3B es un ejemplo de un circuito eléctrico equivalente al dispositivo mostrado en la Fig. 3A.

La Figura 4 es un ejemplo de un sistema de ensayo.

La Figura 5A es un gráfico de un ejemplo de normalización usando la corriente TB-LB.

La Figura 5B es un gráfico de un ejemplo de normalización usando la corriente HO-LB.

### **Descripción de las realizaciones**

45 Ahora se hará referencia en detalle a las realizaciones presentes de la invención, ejemplos de las cuales son ilustradas en los dibujos adjuntos. Siempre que es posible, se usarán los mismos números de referencia en todos los dibujos para referirse a partes iguales o semejantes.

50 El uso de estándares internos fluorescentes para la normalización de las señales medidas para las sondas fluorescentes en dispositivos microfluídicos pueden adolecer de una falta de estabilidad de la señal estándar interna (EI). Si un reactivo tal como un tampón de disolución de muestras o un reactivo de anticuerpos o incluso un tampón de separación incluye un estándar interno, la concentración de ese estándar variación con el grado de evaporación o condensación dentro del recipiente de almacenamiento usado para almacenar el estándar interna. Si el recipiente se destapa durante el día para realizar ensayos, el grado de evaporación a temperatura ambiente puede ser bastante significativo, del orden del 10% al 20% en 1 a 2 semanas de uso. Esto dará como resultado un sesgo de los resultados de los ensayos que usen este estándar interno para su normalización.

Usando la medición de la conductividad eléctrica o una combinación de las mediciones de la conductividad eléctrica y de la señal estándar interna fluorescente, puede normalizarse la señal fluorescente de los ensayos microfluídicos de tal forma que las variaciones del instrumento y del chip no introduzcan un sesgo importante en los resultados del ensayo. Puede usarse una primera medición, la conductividad eléctrica de la solución que contiene el estándar interno para controlar y corregir los cambios en el estándar interno.

Los cambios en la concentración de una solución estándar interna a causa de la evaporación o la condensación pueden estar correlacionados con cambios en la conductividad de la solución estándar interna. La conductividad de la solución estará dominada por la concentración de las sales tampón en la solución, tales como NaCl u otros tampones iónicos. La conductividad es proporcional a la concentración de NaCl, de modo que, tras determinar la conductividad inicial, puede usarse un amperímetro estable para medir el grado de cambio en la concentración de NaCl. Conocido el cambio en la concentración de NaCl, puede extrapolarse el cambio en otros constituyentes del tampón, tal como el estándar interno; por ello, puede realizarse una correlación en la concentración del estándar interno durante el curso de su vida útil en el sistema microfluídico, y puede usarse este EI de forma fiable para normalizar las señales del ensayo.

La Fig. 1A muestra un ejemplo de la relación entre la conductividad de la solución y la concentración de NaCl. Y1 se refiere a la conductividad medida y X1 se refiere a la concentración de NaCl obtenida a partir de la conductividad medida. La Fig. 1B muestra un ejemplo de la relación entre la conductividad de la solución y la concentración del estándar interno. Y2 se refiere a la conductividad calculada y X2 se refiere a la concentración estándar interna obtenida a partir de la conductividad calculada.

Las Figuras 2A y 2B muestran mediciones experimentales usando NaCl como sal tampón y tinción fluorescente HiLyte como estándar interno, respectivamente. Existe una correlación de la conductividad entre la sal tampón y la concentración EI según es medida en unidades fluorescentes relativas (RFU). La mayor concentración de tampón fue 125 mM de NaCl y 8,75 uM de tinción HiLyte, que se diluyeron en agua que contenía un 0,05% de Tween-20, un detergente no iónico. El control negativo no tiene nada de NaCl ni de tinción HiLyte y es agua desionizada que contiene un 0,05% de Tween-20. Se realizaron mediciones por medio de un espectrofluorímetro y un electrodo de conductividad. Se demuestra una proporcionalidad lineal para la conductividad y la fluorescencia de la tinción con estas concentraciones de sal que están en concentraciones relevantes de ensayo.

La extrapolación de la concentración de EI puede ser indirecta si se mide una conductividad total de varios reactivos del ensayo. Por ejemplo, puede considerarse un dispositivo microfluídico como el presentado en la Fig. 3A. En esta figura, todos los pocillos están indicados por un círculo, pero solo tres pocillos, cada uno marcado con un punto, contienen un electrodo. El dispositivo tiene un pocillo de tampón final (TB), un pocillo de tampón inicial (LB), pocillos de desecho (WA) 1 a 4 y pocillos A a C, conteniendo el pocillo B una muestra estándar interna. Hay también un pocillo de transferencia (HO) dispuesto entre el pocillo WA 4 y el LB.

El circuito eléctrico equivalente del dispositivo microfluídico mostrado en la Fig. 3B puede ser representado en términos de una red con forma de estrella con tres resistencias conectadas a un nodo interno común. Los tres pocillos con los electrodos corresponden a los nodos del circuito eléctrico equivalente de la Fig. 3B. O sea, el nodo 1 corresponde al pocillo TB, el nodo 2 al pocillo HO y el nodo 3 al pocillo LB. Aplicando una tensión ( $V_2 - V_1$ ) entre los nodos 1 y 2, y midiendo la corriente, puede medirse la suma de las resistencias  $R_1$  y  $R_2$ :

$$R_{12} = R_1 + R_2 = (V_2 - V_1) / I_{12}$$

Las resistencias  $R_{13}$  and  $R_{23}$  entre los nodos 1 y 3 y los nodos 2 y 3, respectivamente, pueden medirse de manera similar. Conocidas las tres sumas de las resistencias, los valores individuales de las resistencias  $R_1$  a  $R_3$  pueden ser calculados como sigue:

$$R_1 = (R_{12} + R_{13} - R_{23}) / 2$$

$$R_2 = (R_{12} + R_{23} - R_{13}) / 2$$

$$R_3 = (R_{13} + R_{23} - R_{12}) / 2$$

Con respecto al dispositivo microfluídico mostrado en la Fig. 3A, antes de que se realice ningún ensayo eléctrico, se llena el dispositivo aplicando un vacío simultáneamente a los pocillos WA de desecho, mientras que los otros pocillos están a la presión atmosférica, pero llenos de una solución de reactivos o tampón. Esto crea el patrón de llenado mostrado en la Fig. 3A. Se llena cada segmento del canal, con una excepción, con una solución que se origina exclusivamente en uno de los pocillos. La excepción es el segmento denominado zona de apilamiento, situada entre la intersección del último canal de desecho y la intersección de transferencia. Ese segmento se llenará con una mezcla de soluciones que proceden del pocillo de HO y del pocillo del LB, en proporción con la conductividad hidrodinámica de estas dos ramas.

En cada canal, se conocen la geometría y el origen de la solución que llena cada segmento. En el canal de HO (entre el pocillo de HO y la zona de apilamiento) y el canal del LB (entre el pocillo del LB y la zona de separación), cada uno de estos canales es llenado por completo con solución que procede del pocillo respectivo al extremo del canal. Con base en el procedimiento descrito en lo que antecede, la resistencia eléctrica de estos canales está dada por:

$$R_n = \sigma_n^{-1} \frac{Ln}{An},$$

siendo  $R_n$  la resistencia del canal

$$G_n = 1/R_n$$

siendo  $L$  la longitud del canal, siendo  $A$  el área del corte transversal del canal, siendo  $\sigma$  la conductividad eléctrica, siendo  $R$  la resistencia eléctrica y siendo  $G$  la conductancia eléctrica. Puesto que se conoce la geometría del canal, puede deducirse la conductividad real de la solución procedente de los pocillos HO y LB. Por lo tanto, esta medición está asociada con las variaciones de la conductividad que pueden originarse en las fluctuaciones en la constitución de los tampones, el envejecimiento durante el almacenamiento, la absorción de dióxido de carbono de la atmósfera y la evaporación del agua mientras la solución está en los pocillos.

La situación para el canal conectado al tampón final (TB) es más compleja, porque están presentes en ese canal soluciones que se originan en cada uno de los pocillos. Se tratará la sección de este canal más cercana a la intersección de HO, denominada zona de apilamiento. Durante la carga al vacío, se llena la zona de apilamiento con una mezcla de la solución del pocillo de HO y de la solución del pocillo del LB, en la proporción dada por:

$$\alpha_{HO} = \frac{G_{HO}^h}{G_{HO}^h + G_{LB}^h}, \quad \alpha_{LB} = \frac{G_{LB}^h}{G_{HO}^h + G_{LB}^h}$$

siendo  $G_{HO}^h$  la conductividad hidrodinámica del canal de HO, y siendo  $G_{LB}^h$  la conductividad hidrodinámica del canal del LB. Las conductividades eléctricas son aproximadamente proporcionales a las concentraciones iónicas en la solución, según indican los datos de la Figura 2A, y esas concentraciones se mezclarán según estas relaciones de llenado para obtener:

$$\sigma_{apilamiento} = \alpha_{HO}\sigma_{HO} + \alpha_{LB}\sigma_{LB}$$

y con esta conductividad, junto con la geometría conocida de la zona de apilamiento, la resistencia de la zona de apilamiento se da como sigue:

$$R_{apilamiento} = \sigma_{apilamiento}^{-1} \frac{L_{apilamiento}}{A_{apilamiento}}$$

Restar esta resistencia de la resistencia total  $R_1$  del canal conectado con el pocillo del TB da como resultado la suma de las resistencias restantes:

$$R_n = R_1 - R_{apilamiento} = R_{TB} + R_{Ab\ de\ ADN} + R_{muestra} + R_{Ab\ marcado}$$

correspondiendo las resistencias de la parte derecha a los segmentos de canal llenados con las soluciones del pocillo del TB, del pocillo A de Ab de ADN, del pocillo de muestra, y del pocillo de Ab marcado, respectivamente.

Debido a la falta de más contactos eléctricos, no es posible dividir la resistencia  $R_n$  en componentes adicionales. Sin embargo, un objetivo es corregir las fluctuaciones debidas a la geometría del canal (especialmente la profundidad) y a la evaporación en los pocillos. Estos dos factores son comunes en todo el chip, incluyendo la evaporación, que puede suponerse que sea la misma en todos los frascos y pocillos de reactivos, porque tienen la misma geometría, y están expuestos a las mismas condiciones térmicas. Esto puede efectuarse usando la conductancia eléctrica  $G_n = 1/R_n$  como factor normalizador.

En la exposición siguiente, se supone que se usa  $G_n$  como conductancia normalizadora, dado que es la más influida por la conductancia real del tapón de muestra. Sin embargo, con la suposición de que la evaporación es similar en todos los pocillos y de que las variaciones de espesor son también similares en todo el dispositivo, podría usarse cualquier conductancia medida. Por ejemplo, en la terminología establecida en lo que antecede, puede usarse  $G_{23} =$

$1/R_{23}$ , lo cual elimina la necesidad de extraer la conductancia individual de cada rama de la estructura. Cada situación particular dictará cuál es la mejor opción.

5 En general, la señal observada por detección óptica fluorescente es proporcional al número de moléculas fluorescentes presentes en el volumen de detección óptica. Dado que el número es dado por la concentración de moléculas fluorescentes multiplicada por el volumen de detección, se obtiene la ecuación siguiente:

$$S = f \cdot C \cdot V_{\text{detección}}$$

en la que S es la señal, f es una constante de proporcionalidad que tiene en cuenta todos los factores ópticos implicados, la intensidad de la luz incidente, la eficiencia de la fluorescencia, etcétera, C es la concentración de las moléculas fluorescentes y  $V_{\text{detección}}$  es el volumen de detección. Dado que el volumen de detección  $V_{\text{detección}}$  es proporcional a la profundidad D del canal, esto también puede escribirse como:

$$S = f' \cdot C \cdot D$$

10 Con la evaporación de una fracción  $\epsilon$  del volumen del pocillo, todas las concentraciones aumentarán en un factor de  $1/(1 - \epsilon)$ , y esto da como resultado:

$$S = \frac{f' \cdot C^0 \cdot D}{1 - \epsilon}$$

siendo  $C^0$  la concentración de moléculas fluorescentes antes de la evaporación. La conductancia eléctrica  $G_n$  de la sección del canal descrita en lo que antecede puede variar con la profundidad del canal y el grado de evaporación. Para un canal dado que tenga secciones de diferentes anchuras, o lleno de diferentes soluciones, se da, en general,

15 la siguiente ecuación:

$$G_n = \left\{ \sum \sigma_i^{-1} \frac{L_i}{DW_i} \right\}^{-1}$$

Sin embargo, dado que las conductividades son proporcionales a las concentraciones, que están multiplicadas por un factor de  $1/(1 - \epsilon)$  cuando ocurre evaporación, esto puede escribirse como sigue, en presencia de evaporación, siendo las conductividades eléctricas  $\sigma_i^0$  los valores antes de que ocurra la evaporación:

$$G_n = \frac{D}{1 - \epsilon} \left\{ \sum (\sigma_i^0)^{-1} \frac{L_i}{W_i} \right\}^{-1}$$

20 Esta ecuación, junto con la de S, dada más arriba, pone de manifiesto que ambas cantidades varían de la misma manera en función de la profundidad D del canal y el grado de evaporación  $\epsilon$ . Por lo tanto, resulta la ecuación siguiente:

$$\frac{S}{G_n} = f'' C^0,$$

25 una cantidad proporcional a la concentración de moléculas fluorescentes antes de la evaporación (por la constante de proporcionalidad  $f''$ ) e independiente del grado de evaporación y de la profundidad del canal. Así, usar esta constante de proporcionalidad para el análisis ulterior, la calibración, el establecimiento de curvas estándar, etcétera, debería llevar a una mayor precisión y a la independencia de factores externos variables tales como las variaciones en la evaporación o la profundidad del canal.

Un calibrador recién abierto con una concentración conocida ( $C^0$ ) de analito sería medido para detectar la señal fluorescente y  $G_n$  para determinar  $f''$ . Luego se usa  $f''$  para calcular la concentración desconocida ( $C^x$ ) del analito de muestra a partir de la señal de fluorescencia medida y de la relación de conductividad.

$$\frac{S^x}{G_n} \times \frac{1}{f''} = C^x$$

30 En resumen, si la evaporación aumenta la sal y la conductividad en cierto incremento, cabe esperar que las relaciones de evaporación sean coherentes entre cada uno de los recipientes y pocillos. Eso significa que cualquiera

de los posibles valores medibles de resistencia o conductancia eléctricas puede ser usado con fines de normalización. Eso incluye valores de conductancia de segmentos de dispositivos que no contienen realmente la muestra.

5 El procedimiento aquí descrito puede ser usado para la normalización de ensayos electroforéticos microfluídicos u otros ensayos que usen electrodos para medir la corriente eléctrica. La medición de la corriente puede ser usada no solo para estandarizar o normalizar un estándar interno para corregir la evaporación, sino que la corriente puede ser usada también para corregir la variación en la dimensión, la profundidad y la anchura del canal. La variación de los dispositivos microfluídicos en la geometría puede ocurrir fundamentalmente por una variación en la profundidad y la anchura del canal. La microfabricación implica a menudo técnicas de tratamiento del silicio que decapan matrices de  
10 vidrio o silicio para formar los canales directamente o formar un molde que se usa para producir el canal en sustratos de polímeros termoplásticos (plásticos). Estas técnicas pueden introducir variaciones sutiles en la geometría del canal.

15 La conductividad de un diseño dado de canal microfluídico es una función de la conductividad del tampón y del área del corte transversal del canal. Por lo tanto, existe una relación muy directa entre la profundidad/geometría del canal y la conductancia de la red de canales llenos de tampón. Si se especifica una sección transversal/conductividad nominal, la desviación de ese valor nominal puede ser calculada, entonces, midiendo la conductancia. Además, la señal de ensayo de ensayos dependientes de la sección transversal del canal, como los ensayos fluorimétricos, puede ser normalizada midiendo la conductancia del canal, usando los tampones de ensayo estandarizados con conductividad estándar para botellas recién abiertas.

20 El procedimiento describe medios para normalizar la concentración estándar interna midiendo un parámetro independiente, la conductancia del tampón, en un sistema con reactivos bien caracterizados y en un dispositivo microfluídico bien definido. La conductividad de una solución estándar interna fresca puede ser medida, ya sea en aislamiento o como parte de un sistema que esté sujeto a una variación uniforme de la concentración de reactivos, como la evaporación. Pueden usarse las mediciones recogidas de la conductancia para normalizar las señales del  
25 ensayo que dependen de las dimensiones de los canales microfluídicos, tal como la medición de la señal de ensayo de fluorescencia.

El procedimiento ejemplar anterior puede ser implementado en un sistema 100 de ensayo como el mostrado esquemáticamente en la Fig. 4. El sistema de ensayo ejemplar incluye un sustrato 110 con pocillos y microcanales que conectan los pocillos, para contener reactivos de tampón, uno de los cuales es para contener una solución  
30 estándar interna; un miembro 120 de circuito, tal como un dispositivo para medir la conductancia eléctrica entre los pocillos con reactivos de tampón; un miembro 130 de control, tal como una CPU, para determinar una concentración de sal o iones de los reactivos de tampón a partir de las mediciones de conductancia eléctrica entre los pocillos; un miembro 140 de memoria, tal como una RAM o un disco duro, para almacenar y recuperar información predeterminada. El miembro 130 de control extrapola la concentración de sal o iones a una concentración de la  
35 solución estándar interna con base en la información predeterminada en el miembro 140 de memoria.

El sistema 100 de ensayos puede ser un sistema de ensayos electroforéticos microfluídicos, y el miembro 130 de control puede normalizar los resultados del ensayo con base en la concentración de la solución estándar interna o también con una señal fluorescente estándar interna almacenada en el miembro de memoria. El miembro 130 de control puede también normalizar resultados de ensayo por las variaciones dimensionales geométricas del sistema comparando la medición de la conductancia eléctrica con información estándar almacenada en el miembro de  
40 memoria.

La información predeterminada pueden ser datos para correlacionar información de la concentración de sal o iones con la concentración de la solución estándar interna.

### Ejemplos

45 Se llevó a cabo un ensayo de alfa-fetoproteína (AFP) usando un dispositivo microfluídico mostrado en la Fig. 3A, según la descripción del Ejemplo 1 del documento WO2007/027495. En los ejemplos que siguen, cada composición de tampón para el ensayo mostrada en la Tabla 1 fue usada como concentración del tampón al 100%. Se usó como estándar interno (EI) ADN de 2kb marcado terminalmente con fluorescencia.

Tabla 1: Composición de los tampones

Composición del tampón para el pocillo del TB	Composición del tampón para el pocillo de Ab de ADN	Composición del tampón para el pocillo de muestra	Composición del tampón para el pocillo de Ab marcado	Composición del tampón para los pocillos de HO y LB
75mM Tris	75mM Tris pH8	75mM Tris pH8	75mM Tris pH8	75mM Tris pH8
125mM HEPES	50mM NaCl	50mM NaCl	50mM NaCl	50mM NaCl
0,9% pDMA	0,9% pDMA	0,9% pDMA	0,9% pDMA	0,9% pDMA
	200nM 250bp anticuerpo anti-AFP marcado con ADN	100pM AFP-L1	100nM segundo anticuerpo anti-AFP marcado con fluorescencia	
	250pM ADN de 2kb (EI) marcado con fluorescencia			

Para simular las condiciones de evaporación y condensación de la composición de tampón, la concentraciones de los componentes del tampón para cada pocillo fueron cambiadas del 80% al 120% en incrementos del 10%. En un ensayo real, la concentración del tampón puede cambiar por evaporación o condensación, pero la concentración de la propia AFP no cambiaría, porque la solución de muestra del analito es suministrada inmediatamente antes de su uso. Así, para este experimento, la muestra de antígeno de la AFP fue mezclada con el tampón de muestra hasta una concentración final fijada de 100pM. En cada tanda, con referencia a la Fig. 3A, la composición de tampón que contenía el EI fue puesta en el pocillo “Ab de ADN”, la composición de tampón que contenía AFP-L1 en el pocillo “Muestra”, la composición de tampón que contenía el segundo anticuerpo anti-AFP marcado con fluorescencia en el pocillo “Ab marcado”, la composición de tampón para el pocillo TB en el pocillo “TB”, la composición de tampón para los pocillos HO y LB en el pocillo “HO” y el pocillo “LB”; y, mediante la aplicación de vacío desde WA1, WA2, WA3 y WA4, cada tampón fue introducido en el canal. En cada tanda, se llevó a cabo electroforesis capilar (CE) después de rellenar los canales capilares con el tampón.

La reacción antígeno-anticuerpo y la separación tienen lugar en un canal capilar durante la electroforesis. Se detectaron señales complejas separadas de EI y antígeno-anticuerpo en cierto punto en los canales capilares (zona de separación). Las señales de corriente entre los pocillos TB y LB y entre los pocillos HO y LB fueron monitorizadas durante la electroforesis y fueron usadas para normalizar los picos del EI.

El pico del EI fue normalizado usando la siguiente ecuación.

$$EI_{Normalizado} = EI_{Muestra} \left( \frac{A_{Referencia}}{A_{Muestra}} \right),$$

en la que  $EI_{Muestra}$  representa la señal pico del EI en que se supone que ocurrieron la condensación o la evaporación.  $A_{Muestra}$  representa la corriente con la condensación o la evaporación.  $A_{Referencia}$  representa la corriente sin condensación o evaporación.  $EI_{Normalizado}$  representa la señal EI normalizada por la corriente medida.

La señal de AFP fue normalizada usando la siguiente ecuación.

$$AFP_{Normalizada} = AFP_{Muestra} \left( \frac{EI_{Referencia}}{EI_{Normalizado}} \right),$$

en la que  $AFP_{Muestra}$  representa la señal pico de la AFP en que se supone que ocurrieron la condensación o la evaporación.  $AFP_{Referencia}$  representa la señal del EI sin condensación o evaporación.  $AFP_{Normalizada}$  representa la señal normalizada de la AFP.

A continuación, se muestran en la Tabla 2 y en la Tabla 3 los resultados de diversas señales medidas y de la normalización usando la corriente TB-LB y la corriente HO-LB.

Tabla 2: Normalización de la corriente TB-LB

Concentración del tampón	Corriente TB-LB	Señal EI	Señal AFP	AFP normalizada por la señal $EI_{Muestra}$	AFP normalizada por la señal $EI_{Normalizado}$
80,0	96,0	127,1	107,5	109,7	95,7
90,0	109,7	134,4	115,4	111,4	108,3
100,0	115,7	129,7	101,0	101,0	101,0
110,0	129,1	163,7	120,8	95,7	108,7
120,0	134,6	172,4	107,0	80,5	96,9



Tabla 3: Normalización de la corriente HO-LB

Concentración del tampón	Corriente HO-LB	Señal EI	Señal AFP	AFP normalizada por la señal EI <sub>Muestra</sub>	AFP normalizada por la señal EI <sub>Normalizado</sub>
80,0	82,1	127,1	107,5	109,7	91,0
90,0	91,5	134,4	115,4	111,4	105,6
100,0	94,1	129,7	101,0	101,0	101,0
110,0	106,9	163,7	120,8	95,7	106,8
120,0	113,2	172,4	107,0	80,5	93,7

Los resultados de estas tablas están trazados en las Figuras 5A y 5B, respectivamente. En ambos casos, la señal de AFP, después de la normalización por su correspondiente señal de EI<sub>Muestra</sub>, disminuye con la concentración creciente del tampón, porque la concentración de EI<sub>Muestra</sub> en el tampón se vuelve crecientemente concentrada. Sin embargo, para cada concentración del tampón, la señal de AFP, después de la normalización por correspondiente señal EI<sub>Normalizado</sub>, da un valor cercano a la señal de AFP con la concentración del tampón al 100% (sin concentración ni condensación). Es decir, las señales de AFP normalizadas por las correspondientes señales normalizadas del EI dan una curva plana. El ejemplo indica que la señal pico del EI puede ser debidamente normalizada aunque la concentración del tampón en el que se incorpore el EI cambie, por ejemplo, por la evaporación o la condensación.

- 5
- 10
- Otras realizaciones de la invención resultarán obvias para los expertos en la técnica a partir de la consideración de la memoria y la práctica de la invención dada a conocer en el presente documento. Se pretende que la memoria y los ejemplos sean considerados únicamente ejemplares.

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento de normalización para un sistema de ensayos que comprende:
  - proporcionar dentro del sistema de ensayos un tampón que incluye una solución estándar interna;
  - obtener una medición de la conductancia eléctrica del tampón antes de comienzo del ensayo;
  - obtener un cambio de la concentración del tampón con base en la medición de la conductancia eléctrica;
  - determinar la concentración de la solución estándar interna con base en el cambio de concentración del tampón para la normalización de los resultados de los ensayos.
2. El procedimiento según la reivindicación 1 en el que:
  - (i) se proporciona el tapón para el estándar interno; o
  - (ii) el tampón comprende una pluralidad de constituyentes, uno de los cuales es la solución estándar interna; o
  - (iii) la conductancia eléctrica del tampón es aproximadamente proporcional a la concentración de sales o iones en el tampón.
3. El procedimiento según la reivindicación 1 en el que el tampón comprende una pluralidad de constituyentes, uno de los cuales incluye la solución estándar interna; y la medición de la conductancia eléctrica del tampón es una medición de la conductancia eléctrica total de la pluralidad de constituyentes, preferentemente la concentración de la solución estándar interna, se obtiene extrapolando el cambio de concentración del tampón.
4. El procedimiento según la reivindicación 1 que, además, comprende:
  - antes de la obtención de la medición de la conductancia eléctrica previa al comienzo de un ensayo, obtener una concentración inicial del tampón y una correspondiente medición de la conductancia eléctrica del tampón.
5. El procedimiento según la reivindicación 1 en el que el sistema es un sistema de ensayo electroforético microfluídico.
6. El procedimiento según la reivindicación 1 en el que los resultados del ensayo son normalizados con base en una señal estándar interna fluorescente y en la concentración de la solución estándar interna.
7. Un procedimiento de normalización para un sistema de ensayos que comprende:
  - proporcionar dentro del sistema de ensayo una pluralidad de constituyentes del tampón, uno de los cuales incluye una solución estándar interna;
  - obtener una medición de la conductancia eléctrica de la pluralidad de constituyentes del tampón antes de iniciar un ensayo;
  - obtener un cambio de concentración de sales o iones dentro de la pluralidad de constituyentes del tampón con base en la medición de la conductancia eléctrica;
  - determinar una concentración de la solución estándar interna con base en el cambio de concentración de sales o iones para normalizar los resultados del ensayo.
8. El procedimiento según la reivindicación 7 en el que:
  - (i) la medición de la conductancia eléctrica de los constituyentes del tampón es una medición de la conductancia eléctrica total de los constituyentes del tampón; preferentemente, se obtiene la concentración de la solución estándar interna extrapolando el cambio de concentración de sales o iones dentro de la pluralidad de los constituyentes del tampón; o
  - (ii) la conductancia eléctrica del tampón es aproximadamente proporcional a la concentración de sal o iones en el tampón.
9. El procedimiento según la reivindicación 7 que, además, comprende:
  - antes de la obtención de la medición de la conductancia eléctrica previa al comienzo de un ensayo, predeterminar una concentración inicial de los constituyentes del tampón y una correspondiente medición de la conductancia eléctrica de los constituyentes del tampón.
10. El procedimiento según la reivindicación 7 en el que el sistema es un sistema de ensayo electroforético microfluídico.
11. El procedimiento según la reivindicación 7 en el que los resultados del ensayo son normalizados con base en una señal estándar interna fluorescente y en la concentración de la solución estándar interna.
12. Un procedimiento de normalización para un sistema de ensayos que comprende:
  - proporcionar dentro del sistema de ensayo un tampón que incluye una solución estándar interna;

obtener una medición de la conductancia eléctrica del tampón antes de iniciar un ensayo; y normalizar los resultados del ensayo con base en la medición de la conductancia eléctrica.

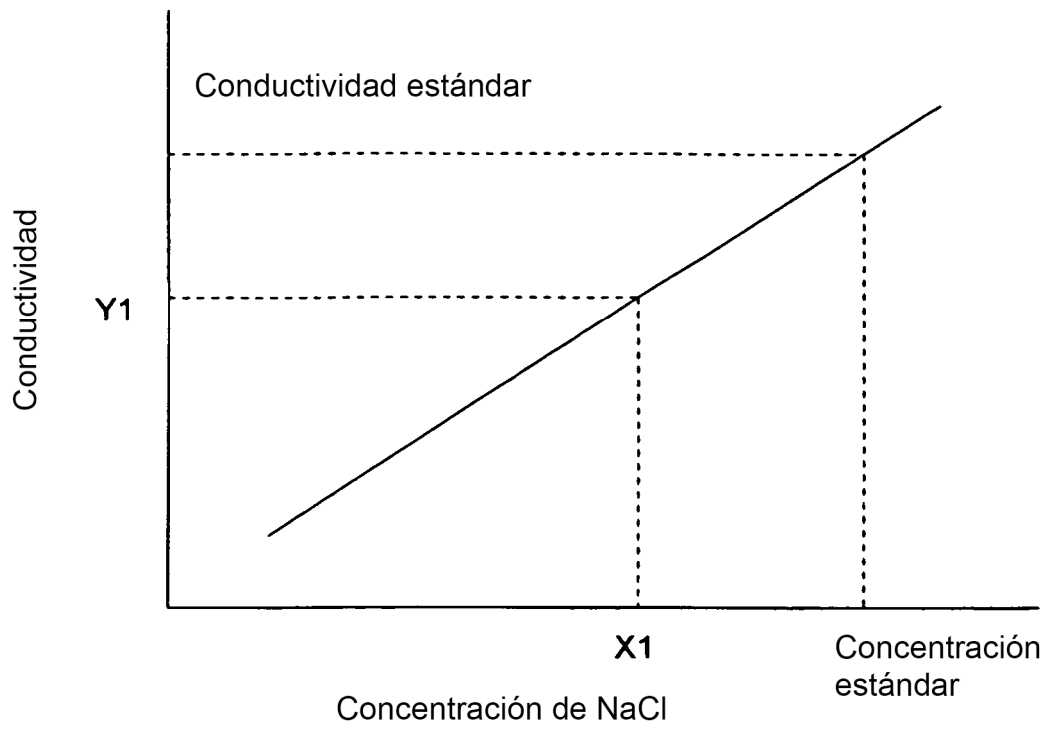
13. El procedimiento de normalización según la reivindicación 12 que, además, comprende:

5 obtener un cambio de concentración del tampón con base en la medición de la conductancia eléctrica; y determinar la concentración de la solución estándar interna con base en el cambio de concentración del tampón para normalizar los resultados del ensayo.

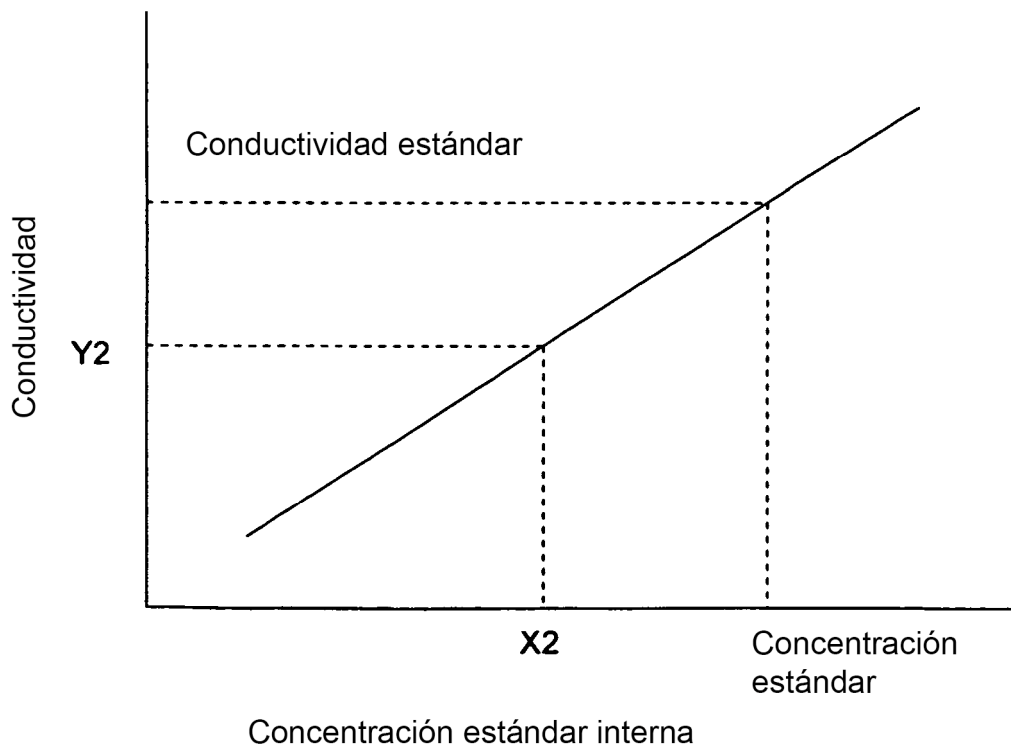
14. El procedimiento de normalización según la reivindicación 12 que, además, comprende:

comparar la medición de la conductancia eléctrica con datos predeterminados; y normalizar los resultados del ensayo con base en la comparación.

10



**Fig. 1A**



**Fig. 1B**

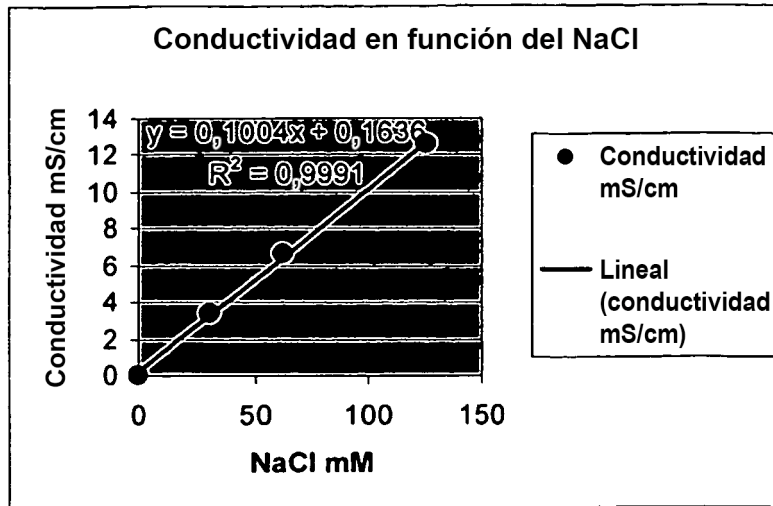


Fig. 2A

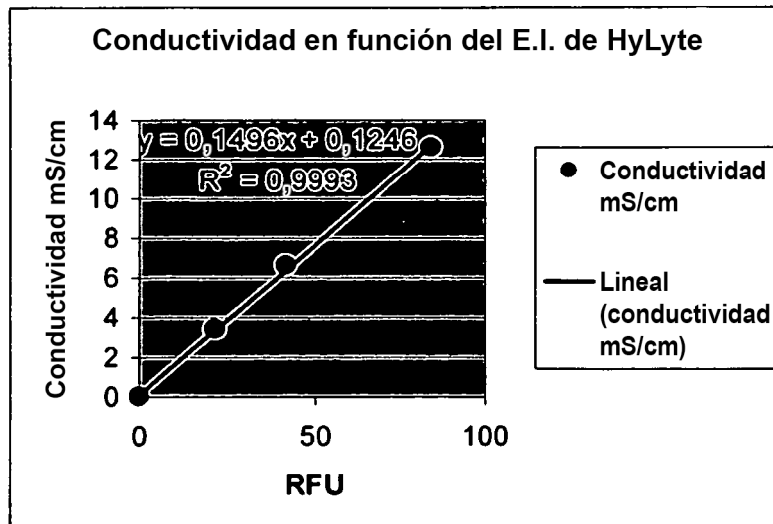


Fig. 2B

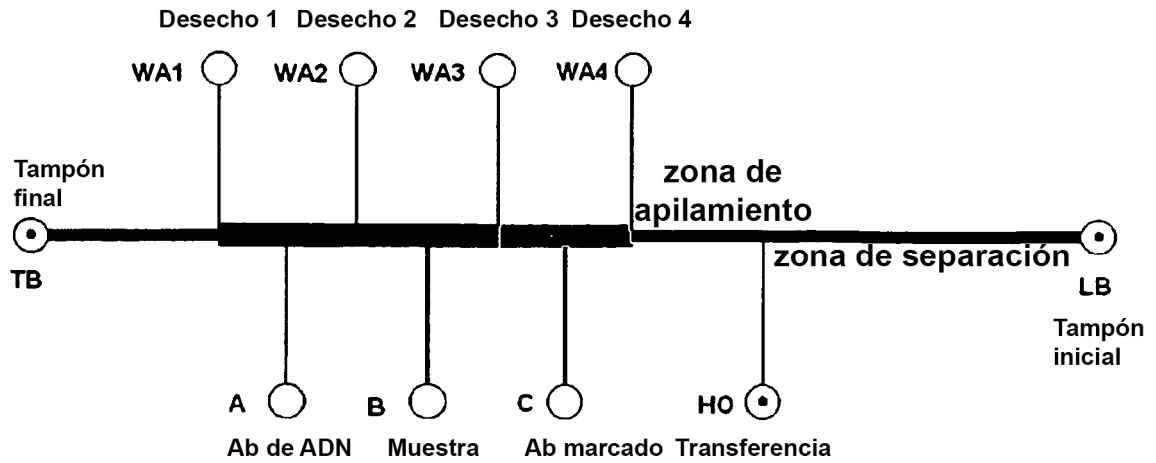


Fig. 3A

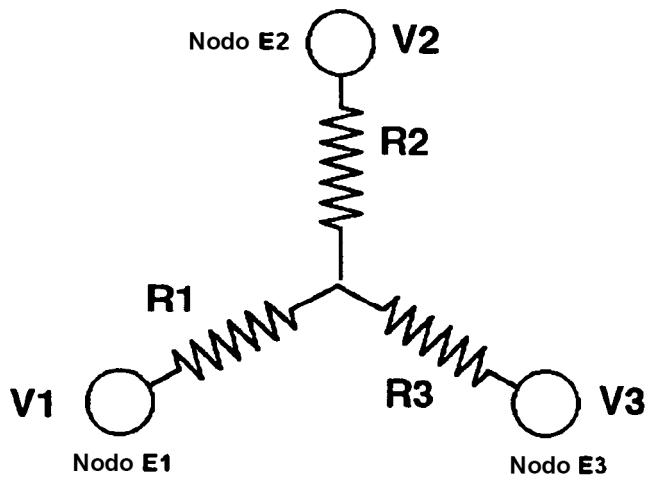
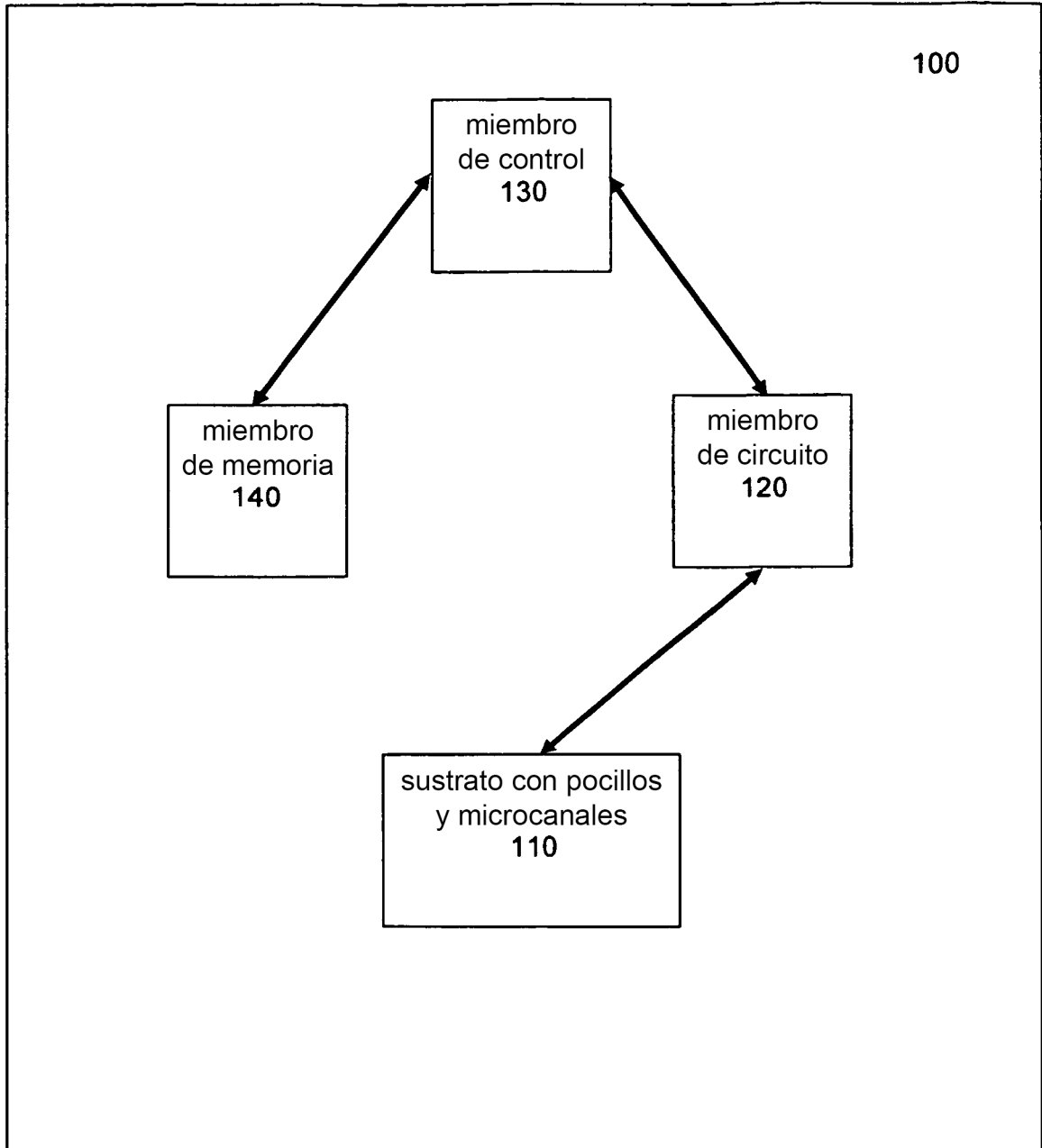


Fig. 3B



**Fig. 4**

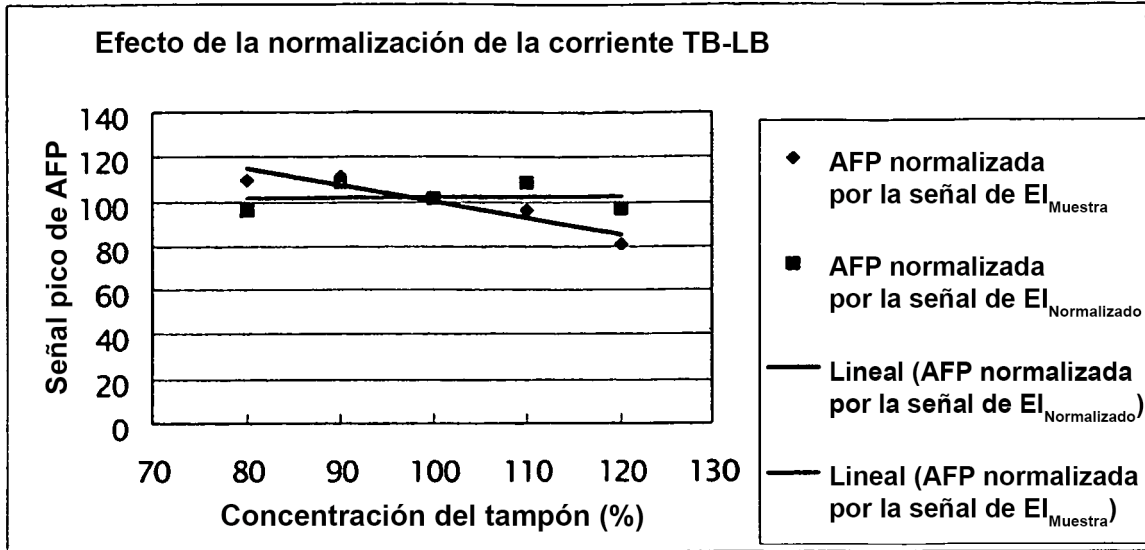


Fig. 5A

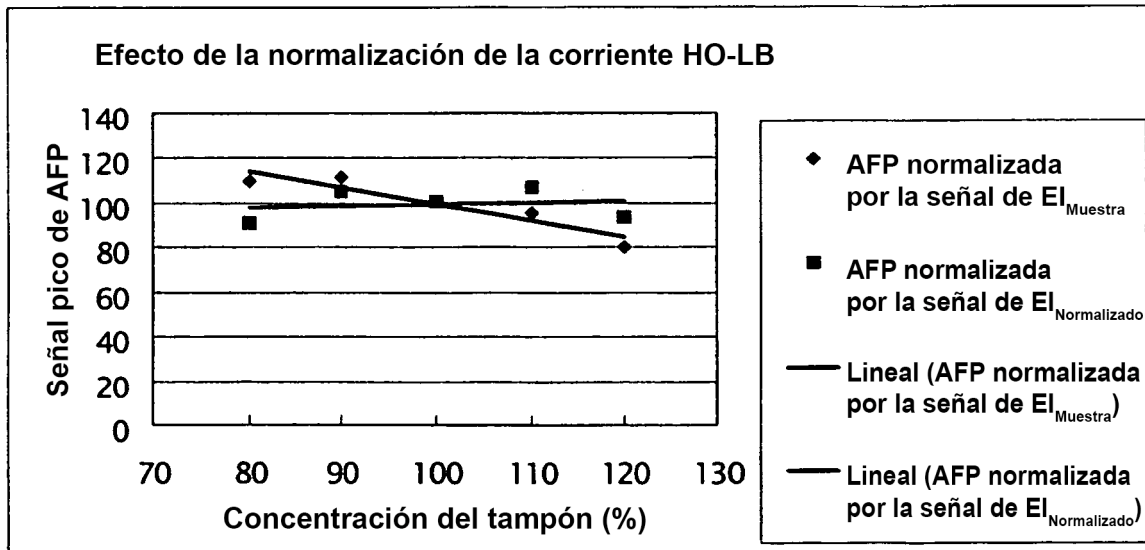


Fig. 5B