

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 540 263**

51 Int. Cl.:

**C12M 1/34** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.04.2007 E 07872144 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.03.2015 EP 2007870**

54 Título: **Sustratos porosos funcionales para fijación de biomoléculas**

30 Prioridad:

**19.04.2006 US 407882**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**09.07.2015**

73 Titular/es:

**GORE ENTERPRISE HOLDINGS, INC. (100.0%)  
551 PAPER MILL ROAD, P.O. BOX 9206  
NEWARK, DE 19714-9206, US**

72 Inventor/es:

**DUTTA, ANITA;  
FLANNERY, HEIDI y  
MORTIMER, WILLIAM P.**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 540 263 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

Sustratos porosos funcionales para fijación de biomoléculas

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a sustratos porosos funcionales y, más particularmente, a dichos sustratos usados en una aplicación de microserie para la detección de biomoléculas.

**Antecedentes de la invención**

Debido a su capacidad de exploración de alto rendimiento, las microseries se han convertido en una herramienta esencial para la industria sanitaria y farmacéutica donde los investigadores están trabajando para diagnosticar enfermedades o descubrir nuevos fármacos. Además, las empresas de agricultura y defensa nacional están utilizando microseries para descubrir información respecto a la presencia de bacterias patógenas dañinas. Dicha exploración simultánea es posible imprimiendo muchas manchas microscópicas, típicamente de 10-250  $\mu\text{m}$  de tamaño, de moléculas biológicas (es decir, biomoléculas tales como fragmentos de ácido nucleico, anticuerpos, péptidos, proteínas, patógenos, células y similares) como sondas en el mismo sustrato para formar una microserie. Una microserie de alta densidad desarrollada con fines de investigación típicamente comprende entre 1.000 a 50.000 manchas de sonda dispuestas en un patrón regular predeterminado en un sustrato, conduciendo de este modo a una densidad de mancha de aproximadamente 50 manchas/ $\text{cm}^2$  a 2.500 manchas/ $\text{cm}^2$ . La dimensión del sustrato puede variar, pero generalmente el sustrato es de un tamaño de 2,54 cm por 7,62 cm .de portaobjetos de microscopio. Es crítico que la superficie del sustrato sea reactiva y capaz de unirse a biomoléculas de sonda de secuencia conocida. En uso, la microserie se hibrida con biomoléculas diana de secuencia desconocida para detectar simultáneamente la respuesta de la diana con las diferentes sondas aplicadas puntualmente sobre la superficie de la serie. Típicamente, las dianas se marcan con colorantes fluorescentes y más habitualmente se usan técnicas de detección basadas en fluorescencia para cuantificar la respuesta de la biomolécula diana a las sondas después de hibridación. La respuesta cuantitativa compuesta de la diana a todas las sondas aplicadas puntualmente sobre el sustrato de microserie son los datos resultantes del experimento de microserie.

25 Los experimentos de microserie pueden emplearse para detectar los niveles de expresión de diversos genes o proteínas para un organismo dado (es decir, ser humano, ratón, planta, bacteria, etc.). Los genes o proteínas altamente expresados son mucho más fáciles de detectar porque su concentración en una muestra dada a menudo es la mayor. Sin embargo, cuando los niveles de expresión son bajos o las muestras son escasas, la tecnología de detección sensible y fiable se convierte en crítica. Este tipo de tecnología de detección es cada vez más importante para estudiar interacciones proteína-proteína o actividad bioquímica de proteínas ya que la concentración de proteínas no puede amplificarse mediante reacciones enzimáticas tales como la reacción en cadena de la polimerasa.

35 Como resultado, dentro de la industria de microseries, existe una necesidad primordial de detección fiable de proteínas y/o ácidos nucleicos poco abundantes. Cuando se intenta medir de forma precisa o detectar dichos bajos niveles en un experimento de microserie, es imperativo que los investigadores empleen componentes del sistema que maximicen la sensibilidad y la proporción global de señal a ruido. Pueden emplearse varios enfoques para influir en la sensibilidad y la proporción de señal a ruido y tres de los comunes son los siguientes: (1) mejora en la sensibilidad y límites de detección de dispositivos de exploración, (2) amplificación aumentada de la señal fluorescente mediante procedimientos de marcaje, y (3) el empleo de un sustrato altamente sensible. La presente invención se centra en potenciar la proporción de señal a ruido a través del empleo de un sustrato de microserie altamente sensible.

40 Puede conseguirse un aumento en la fuerza de la señal aumentando la cantidad de sitios de unión por área unitaria (densidad de sitios funcionales), que finalmente influye sobre la retención de las sondas biomoleculares inmovilizadas y la emisión de una señal aumentada cuando hibrida con moléculas diana marcadas de forma fluorescente. La claridad de la señal también puede potenciarse a través de una reducción de la autofluorescencia inherente de los materiales y/o sistema usado para la detección. Estos enfoques finalmente influirán en la proporción de señal a ruido, aumentando la fuerza de la señal, y/o reduciendo el ruido. Se han intentado varios enfoques de la técnica previa.

50 Muchos procedimientos comunes usados para fabricar microseries de alta densidad usan sustratos bidimensionales de vidrio no poroso que contienen sitios funcionales para unir muestras de interés. Se prefiere el vidrio porque es inerte y tiene baja autofluorescencia inherente lo que contribuye a que aporte menos ruido a la señal que se está detectando, habitualmente medida por técnicas basadas en fluorescencia. Ejemplos de dichos sustratos disponibles en el mercado son portaobjetos UltraGAPS II® (Corning Inc., Life Sciences, Oneonta, NY), portaobjetos Nexterion® (Schott North America, Inc., Louisville, KY), y portaobjetos Array-It® (Telechem International Inc., Sunnyvale, CA).

55 Un inconveniente al uso de vidrio no poroso es que la densidad de sitios funcionales es bastante baja provocando señales relativamente débiles, lo que hace muy difícil detectar la muestra de interés, especialmente cuando se intentan detectar genes o proteínas de baja expresión. Este efecto puede minimizarse aumentando el volumen o concentración de la muestra de interés, sin embargo, el enfoque solamente puede emplearse si está disponible una

muestra suficientemente grande. A menudo, los investigadores están muy limitados por la cantidad, concentración o volumen de una muestra dada. Un enfoque común para aumentar la densidad de sitios funcionales ha sido a través del uso de sustratos porosos para aumentar el área superficial accesible que contiene los sitios funcionales. Tanner y col. (patente de Estados Unidos 6750023) muestran un procedimiento para formar un material funcional para unir una serie de analitos biológicos o químicos aplicando una capa porosa inorgánica a una subestructura no porosa inorgánica.

Se han intentado enfoques alternativos que usan polímeros orgánicos como materiales funcionales. Haddad y col. (documento WO 01/66244) muestra la preparación de series utilizando materiales funcionales no porosos texturizados creados a partir de películas poliméricas orientadas. Los polímeros orgánicos porosos también se han usado en sustratos de microserie y ejemplos de dichos materiales disponibles en el mercado son portaobjetos Vivid Microarray® (Pall Corporation, East Hills, NY) y portaobjetos CAST® (Schleicher & Schuell Biosciences, Inc., Keene, NH), que usan ambas membranas porosas de nylon.

La inversión de fase es una técnica común usada para preparar membranas microporosas a partir de polímeros orgánicos. El uso de dichas membranas como sustratos de microserie se describe en detalle en las solicitudes de patente de Estados Unidos 2003/0219816 de Solomon y col. y 2004/0157320 de Andreoli y col. Se analiza una diversidad de materiales microporosos en la bibliografía, siendo el nailon y la nitrocelulosa los más comunes. El nailon produce los beneficios de que puede volverse fácilmente microporoso y tiene una afinidad natural por ADN. Asimismo, se sabe que la nitrocelulosa es eficaz para unir proteínas. En el caso de nailon y nitrocelulosa, la unión con ADN y/o proteínas depende de los grupos funcionales inherentes presentes en la estructura polimérica del nailon o nitrocelulosa. Por consiguiente, la densidad de sitios funcionales producida por estos materiales está limitada. Además, el tamaño de poro de las membranas de inversión de fase puede no ser suficientemente pequeño para evitar la propagación lateral de manchas que conduce a interferencia limitando de ese modo la densidad de la serie. Otro problema común con el uso de polímeros orgánicos tales como nailon o nitrocelulosa reside en el hecho de que estos materiales poseen de forma inherente alta autofluorescencia.

Como la detección basada en fluorescencia es la técnica más comúnmente usada para cuantificar las biomoléculas diana hibridadas, la alta autofluorescencia contribuye a un ruido de fondo aumentado afectando de forma adversa de ese modo a la claridad de la señal fluorescente. El uso de pigmentos tales como negro de carbono ha demostrado reducir la autofluorescencia. Como alternativa, como se muestra por Montagu (documento WO 2004/018623), el ruido de fondo también puede reducirse mediante el uso de un material funcional delgado (menos de aproximadamente 5 p).

Existe la necesidad de un sustrato de serie que puede fabricarse fácilmente, proporcione alta densidad de sitios funcionales y muestre baja autofluorescencia para maximizar la proporción de señal a ruido. La presente invención aborda todas estas necesidades y proporciona también un nivel muy alto de precisión en ePTFE.

El documento US 562 1019 desvela superficies oxifluoradas refuncionalizadas sobre ePTFE.

El documento WO 00/33078 desvela un sustrato compuesto por vidrio. La capa porosa y la capa funcional se depositan sobre el sustrato usando una solución que comprende TEOS, para crear una red porosa (es decir, sol-gel), y APTES, para proporcionar una funcionalidad.

### **Sumario de la invención**

La presente invención proporciona:

Un sustrato (12) que comprende una microestructura microporosa que comprende politetrafluoroetileno expandido, una capa intermedia que contiene una funcionalidad reactiva, estando depositada la capa intermedia sobre al menos una parte de dicha microestructura, y una capa funcional unida a dicha capa intermedia, comprendiendo dicha capa intermedia un recubrimiento sol-gel o un alcohol polivinílico, teniendo dicha capa funcional sitios funcionales, creados por reacción de sustancias químicas funcionales con la funcionalidad de la capa intermedia, con una densidad de al menos 50 nanomoles/cm<sup>2</sup>.

Un sustrato definido en la reivindicación 1 en el que dichos sitios funcionales tienen una densidad seleccionada de al menos 100 nanomoles/cm<sup>2</sup>, de al menos 250 nanomoles/cm<sup>2</sup>, de al menos 500 nanomoles/cm<sup>2</sup>, o de al menos 1.000 nanomoles/cm<sup>2</sup>.

Un sustrato (12) definido en la reivindicación 1 que comprende adicionalmente una densidad de sitios funcionalizados entre 2.500 y 150.000 nanomoles/cm<sup>3</sup>.

Un sustrato (12) de la reivindicación 1 en el que dichos sitios funcionales se seleccionan entre al menos uno de los grupos hidroxilo, grupos amina, grupos carboxilo, grupos aldehído, y grupos epóxido.

Un sustrato (12) de la reivindicación 1 en el que dicha capa funcional comprende organosilano.

Un sustrato (12) de la reivindicación 1 en el que dicha capa intermedia comprende recubrimiento sol-gel, y dicha

capa funcional comprende organosilano.

Un sustrato (12) de la reivindicación 1 que comprende adicionalmente biomoléculas unidas a los sitios funcionales.

5 Un sustrato (12) de la reivindicación 7 en el que dichas biomoléculas se seleccionan entre al menos uno de los ácidos nucleicos, proteínas, péptidos, oligonucleótidos, anticuerpos, células, enzimas y patógenos.

Un sustrato (12) de la reivindicación 1 usado como componente de al menos uno de una microserie, un filtro activo, una superficie de transferencia, o un dispositivo de diagnóstico.

Un procedimiento para crear un artículo funcionalizado que comprende las etapas de:

- 10 1. proporcionar un sustrato microporoso (12) que comprende politetrafluoroetileno expandido y que tiene una microestructura,  
 2. depositar sobre al menos una parte de dicha microestructura una capa intermedia que comprende una funcionalidad reactiva, comprendiendo dicha capa intermedia un recubrimiento sol-gel o un alcohol polivinílico,  
 15 3. y unir una capa funcional a dicha capa intermedia y hacer reaccionar sustancias químicas funcionales con la funcionalidad de la capa intermedia para crear sitios funcionales de modo que dicho artículo tenga una densidad de sitios funcionales de al menos 50 nanomoles/cm<sup>2</sup>.

Un procedimiento definido en la reivindicación 10 que comprende adicionalmente una densidad de sitios funcionales entre 2.500 y 150.000 nanomoles/cm<sup>3</sup>.

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

- 20 La Fig.1 es una vista en sección transversal de un extremo de una realización ejemplar de la presente invención.  
 La Fig.2(A) es una micrografía electrónica de barrido de la superficie microporosa de una microserie de una realización ejemplar de la presente invención antes de funcionalizarse.  
 La Fig. 2(B) es una micrografía electrónica de barrido de la superficie microporosa de una microserie de una  
 25 realización ejemplar de la presente invención después de funcionalizarse.  
 La Fig. 2(C) es una micrografía electrónica de barrido de la superficie microporosa de una microserie de una realización ejemplar de la presente invención después de funcionalizarse.  
 La Fig. 3(A) es un diagrama de dispersión de la intensidad de señal Cy3 y Cy5 normalizada de microseries usando el sustrato de una realización ejemplar de la presente invención.  
 La Fig. 3(B) es un diagrama de dispersión de la intensidad de señal Cy3 y Cy5 normalizada de microseries  
 30 usando un sustrato de la técnica previa.

#### **Descripción detallada de la invención**

La presente invención se refiere a sustratos porosos y microporosos funcionales mejorados con alta densidad de grupos funcionales y baja autofluorescencia que cuando se usan como sustrato de microserie para la detección bioanalítica proporcionan elevadas proporciones de señal a ruido hasta ahora inasequibles con alto nivel de  
 35 precisión. Estos atributos derivan de la combinación única de la selección de los materiales porosos y microporosos y un procedimiento para funcionalizar estos materiales. Una microserie puede definirse como una herramienta usada para cribar y analizar la información contenida dentro de un genoma. Esta herramienta contiene diferentes sondas biomoleculares (ácido nucleico, proteína, célula, etc.) que se unen químicamente a un sustrato, que puede ser un microchip, un portaobjetos de vidrio o una perla de tamaño microesférico. En el siguiente análisis, "material poroso"  
 40 se refiere a un material con poros que se extienden a través de la sección transversal completa haciendo de ese modo que el material sea permeable a fluidos. Los materiales porosos se caracterizan típicamente por el tamaño de poro de flujo medio. Como alternativa, los materiales porosos pueden caracterizarse por un punto de burbujeo que es una medida del tamaño de poro máximo. Tanto el tamaño de poro de flujo medio como el punto de burbujeo pueden medirse por ensayos de flujo a presión. Los materiales microporosos son un subconjunto de materiales porosos donde el tamaño de poro de flujo medio es menor de aproximadamente 1 µm o el punto de burbujeo es mayor de aproximadamente 0,07 MPa.  
 45

Los materiales porosos de la presente invención son de naturaleza plana y pueden estar en forma de membranas o láminas. Los sustratos porosos de la presente invención son permeables a fluidos debido a la presencia de poros de interconexión que atraviesan la sección transversal completa. El área superficial de esta microestructura es  
 50 considerablemente mayor que la de un material no poroso de igual volumen. La presente invención utiliza esta microestructura y su consiguiente elevada proporción de área superficial a volumen para crear el sustrato de alta densidad funcional. Esta área superficial interna, mejor mencionada como área superficial específica, se refiere al tamaño de poro del material poroso; el área superficial aumenta según disminuye el tamaño de poro promedio del material. Típicamente, el área superficial específica del material poroso es de al menos 0,1 m<sup>2</sup>/g y preferentemente mayor de 1 m<sup>2</sup>/g y mucho más preferentemente mayor de 10 m<sup>2</sup>/g medida por técnicas convencionales de adsorción de gases.  
 55

Un "sitio funcional" como se usa en el presente documento es un sitio localizado en una superficie externa o interna del sustrato poroso. Los sitios funcionales pueden generarse usando las técnicas de modificación superficial descritas en el presente documento, y son útiles para proporcionar sitios de unión a los cuales pueden unirse biomoléculas. En ciertas realizaciones preferidas, las biomoléculas que se unen a los sitios funcionales sirven como moléculas de sonda a las cuales puede unirse una biomolécula diana (típicamente un analito en solución), de forma covalente o no covalente. Ejemplos no limitantes de biomoléculas contempladas por la invención incluyen ácidos nucleicos, oligonucleótidos, y anticuerpos. "Grupo funcional" como se usa en el presente documento es un grupo de átomos que reacciona como una única unidad y determina las propiedades del sitio funcional. Un sustrato funcional es un sustrato poroso que tiene sitios funcionales que residen sobre la superficie de su microestructura. El término "funcionalizar" se refiere al procedimiento en el cual un grupo o grupos funcionales se unen a la microestructura de un sustrato poroso.

Los materiales porosos, con sus altas proporciones inherentes de área superficial específica a volumen ofrecen más área para la funcionalización que sustratos no porosos, tales como vidrio no poroso. Como se ha mencionado previamente, el uso de dichos sustratos porosos funcionales para aplicaciones de microserie se ha mostrado en la bibliografía de la técnica previa tal como en la solicitud de patente de Estados Unidos 2004/0157320 de Andreoli y la patente de Estados Unidos 6750023 de Tanner. Aunque estos contenidos aprovechan el área superficial interna aumentada producida por la microestructura porosa, dependen de la densidad inherente de grupos funcionales del material poroso para sitios de unión. Por ejemplo, Andreoli muestra el uso de nailon poroso como sustrato con la funcionalidad proporcionada por los grupos amida dentro de la estructura química de la molécula de nailon. En comparación, Tanner muestra el uso de vidrio poroso pero depende de la presencia de grupo hidroxilo superficial sobre la superficie del vidrio para la posterior funcionalización a través de tratamiento con silano.

La presente invención adopta un nuevo enfoque para crear el sustrato de alta densidad funcional para aplicación de microseries. El enfoque de la invención comienza con un material poroso que no depende de la naturaleza química inherente del material para crear los grupos funcionales. En su lugar, la microestructura del material poroso se recubre sustancialmente con una capa intermedia que contiene una funcionalidad reactiva, tal como funcionalidad hidroxilo. El sustrato funcional después se crea haciendo reaccionar sustancias químicas funcionales apropiadas con la funcionalidad hidroxilo de la capa intermedia. La funcionalización del sustrato por tanto puede incluir la etapa de depositar una capa intermedia sobre la microestructura porosa. En este enfoque, la elección de la capa intermedia y no del material poroso, ahora controla la densidad de los grupos funcionales. Todos los materiales de la técnica previa que se funcionalizaron posteriormente de acuerdo con estos contenidos de la presente invención mostraron densidad mucho mayor de grupos funcionales.

El sustrato de alta densidad funcional de la presente invención se obtiene partiendo de un material poroso, preferentemente en una forma plana tal como membranas o láminas. Los materiales porosos comprenden membranas de PTFE expandido (ePTFE) disponibles en W. L. Gore and Associates.

El PTFE expandido (ePTFE) se reivindica como el material poroso a causa de su baja autofluorescencia así como por su inactividad química y estabilidad a alta temperatura. Los procedimientos para preparar ePTFE se describen en la patente de Estados Unidos 3.953.566 de Gore. El PTFE expandido es una forma microporosa de PTFE que consiste en poros de forma irregular. Mientras que la proporción excepcionalmente elevada de área superficial a volumen de PTFE expandido microporoso (ePTFE) sugiere que puede servir bien esta aplicación, la forma de poro irregular lo hace un candidato improbable. Sorprendentemente, sin embargo, la irregularidad de la estructura ePTFE, con sus poros no circulares, no compromete el rendimiento; de hecho, ePTFE es el material poroso más preferido. Los poros de PTFE expandido se crean mediante un procedimiento de expansión por estiramiento realizado a elevadas temperaturas. La expansión crea una estructura microporosa en que se interconectan nodos mediante fibrillas finas. Los materiales preferidos de ePTFE se preparan de acuerdo con los contenidos de la patente de Estados Unidos 4.187.390 de Gore.

La elección del tamaño de poro es un factor clave en la selección del material poroso. Para que sea un sustrato de microserie eficaz, los poros deben ser suficientemente pequeños para inhibir la propagación lateral de la solución durante el procedimiento de aplicación puntual. Se cree que si los poros son demasiado grandes, el líquido de aplicación se propagará en todas las direcciones y las manchas toparán unas con otras conduciendo de ese modo a interferencia y contaminación. La distancia mancha a mancha puede aumentarse para evitar este problema, sin embargo, esto compromete la cantidad de manchas que pueden colocarse dentro de un área dada. Por otro lado, los poros pueden ser suficientemente grandes para posibilitar que las biomoléculas entren en los poros y permitan que los reactivos entren y salgan de los poros libremente durante los procedimientos de lavado. La medición del punto de burbujeo es una técnica convencional para caracterizar el tamaño de poro máximo de materiales porosos.

Mientras que la mayoría de los sustratos porosos puede usarse para crear el sustrato de alta densidad funcional de la presente invención, para aplicaciones de microserie, el punto de burbujeo debe ser de al menos 0,007 MPa, preferentemente de al menos 0,070 MPa. Los materiales de ePTFE preferidos poseen valores de punto de burbujeo de al menos 0,070 MPa. Más preferentemente, el material de ePTFE tiene valores de punto de burbujeo de al menos 0,207 MPa.

La microestructura de material de ePTFE microporoso consiste en nodos interconectados por fibrillas y puede caracterizarse por su longitud promedio de fibrilla. La longitud de fibrilla puede medirse tomando una micrografía electrónica de barrido de la superficie de la membrana de ePTFE a un aumento razonablemente alto (tal como a 20.000x) y después midiendo la longitud de las fibrillas entre los nodos. Se toman treinta de estas mediciones de fibrillas y se presenta la longitud promedio de fibrilla como el promedio de estas mediciones. Longitudes promedio de fibrilla más grandes están típicamente asociadas con punto de burbujeo inferior y mayor tamaño medio de poro de flujo. Para los materiales de ePTFE preferidos, se cree que la longitud promedio de fibrilla debe estar entre 0,5 a 5  $\mu\text{m}$ , preferentemente entre 0,5 a 3  $\mu\text{m}$  y mucho más preferentemente entre 0,5 a 2  $\mu\text{m}$ .

El sustrato de alta densidad de sitios funcionales de la presente invención puede formarse usando un material poroso que varía en grosor de 5  $\mu\text{m}$  y superior. El grosor aumentado proporciona mayor superficie interna para la fijación de grupos funcionales conduciendo de este modo a densidad funcional aumentada. Para aplicaciones de microserie, sin embargo, existe un límite al grosor del material poroso. Un material excesivamente grueso no es deseable ya que dicho material puede absorber cantidades excesivas de solución de sonda durante la impresión por contacto causando de ese modo que los pins de impresión se sequen rápidamente, afectando de este modo a la claridad de las manchas. Además, materiales excesivamente gruesos son difíciles de procesar particularmente durante la etapa de lavado después de la hibridación. Un lavado inadecuado de los líquidos de hibridación del material puede conducir a que reactivos residuales causen autofluorescencia aumentada del sustrato. Para un sustrato de microserie, el grosor preferido del material poroso es de aproximadamente 250  $\mu\text{m}$  o menos, más preferentemente aproximadamente 125  $\mu\text{m}$  o menos.

La presente invención se basa en la superficie interna del material poroso para fijar el grupo funcional. El área superficial interna es una función del grosor y el área superficial específica del material poroso. De forma esperada, el área superficial específica es una consideración importante para la selección del material poroso. Sin embargo, el área superficial específica está relacionada con el tamaño de poro. Típicamente, cuanto menor sea el tamaño de poro, mayor será el área superficial específica. Coherente con las necesidades de tamaño de poro, el material poroso con cualquier área superficial específica puede convertirse en uno de alta densidad de sitios funcionales de la presente invención. Sin embargo, para un sustrato de microserie viable, el material poroso debe poseer un área superficial específica de al menos 1  $\text{m}^2/\text{g}$ . El material de ePTFE preferido tiene al menos 1  $\text{m}^2/\text{g}$  de área superficial específica y mucho más preferentemente al menos 10  $\text{m}^2/\text{g}$  de área superficial específica.

Se prefiere que el material poroso que puede usarse para la presente invención esté libre de cualquier aditivo, particularmente aditivos que puedan contribuir a autofluorescencia aumentada. Sin embargo, si fuera necesario, el material poroso puede contener aditivos tales como pigmentos, cargas, colorantes, absorbentes de UV y similares.

Los materiales porosos se convierten en sustratos porosos de alta densidad funcional de la presente invención depositando primero una capa intermedia de recubrimiento funcional que contiene hidroxilo sobre la microestructura completa del material poroso y posteriormente usando química de organosilano para reaccionar con el grupo hidroxilo de la capa intermedia. A continuación se describen detalles de este procedimiento de conversión para el material de ePTFE.

A causa de la hidrofobicidad inherente de ePTFE, soluciones polares tales como tampones de impresión e hibridación de microseries no humedecen el material de sustrato. También, debido a la estructura química de ePTFE, biomoléculas tales como ácidos nucleicos o proteínas no se unen de forma eficaz al material. Por consiguiente, para una unión eficaz de biomoléculas, la superficie de ePTFE debe modificarse y tienen que unirse posteriormente los grupos funcionales. La modificación superficial de ePTFE recubriendo su microestructura usando polímeros orgánicos para volver su superficie hidrófila se ha descrito en las patentes de Estados Unidos 5130024 y 5897955 de Fujimoto y de Drumheller, respectivamente. Se ha descrito un tratamiento hidrófilo similar de ePTFE usando formulaciones sol-gel inorgánicas en la publicación de patente de Japón número 08-250101 y en la solicitud de patente de Estados Unidos 2004/0081886A1 de Zuckerbrod.

Para la presente invención, se prefiere que la modificación superficial se realice usando recubrimientos hidrófilos de baja autofluorescencia que proporcionen grupos hidroxilo con capacidad de posterior reacción con silanos. El alcohol polivinílico (PVOH) es el polímero orgánico preferido para el tratamiento hidrófilo de ePTFE. La reticulación opcional puede conseguirse mediante el uso de aldehídos tales como glutaraldehído.

La solución sol-gel, como se describe a continuación, es una solución más preferida en la medida en que vuelve la superficie de ePTFE más susceptible a funcionalización posterior proporcionando una gran cantidad de grupos hidroxilo. El sol-gel es una técnica para preparar vidrios y cerámicas de óxido metálico especializados hidrolizando intermedios químicos o mezclas de intermedios químicos que pasan secuencialmente a través de un estado de solución y un estado de gel antes de deshidratarse en un vidrio o cerámica. Los detalles del tratamiento sol-gel usado para preparar ePTFE hidrófilo se describen en la publicación de patente de Japón número 08-250101.

La solución de recubrimiento sol-gel preferida se obtiene de tetraetilortosilicato (TEOS), tetrametilortosilicato, o recubrimiento sol-gel derivado de solución de silicato sódico o una suspensión de sílice coloidal. La solución de recubrimiento sol-gel derivada de TEOS es la más preferida. El tratamiento hidrófilo del ePTFE y otros materiales microporosos puede conseguirse de varios modos. Habitualmente, este tratamiento se consigue aplicando una

solución del polímero orgánico o el sol-gel inorgánico a membranas por procedimientos habitualmente conocidos tales como recubrimiento por inmersión, pulverización, recubrimiento por centrifugación, con cepillo, recubrimiento con rodillo, o recubrimiento con barra de Meyer. Debe tenerse cuidado de añadir solamente suficiente del recubrimiento para volver la superficie hidrófila manteniendo al mismo tiempo la porosidad del material. La adición de cantidades excesivas del recubrimiento hidrófilo también aumentará la autofluorescencia del sustrato.

La etapa de tratamiento hidrófilo, descrita anteriormente, vuelve al ePTFE hidrófilo por deposición de un recubrimiento que contiene hidroxilos sobre la microestructura completa. En una etapa posterior, los grupos hidroxilo se hacen reaccionar con organosilanos de baja autofluorescencia para obtener los grupos funcionales deseados dependiendo de las biomoléculas específicas a fijar. Por ejemplo, si tienen que fijarse moléculas de ADN complementario (ADNc) al sustrato, es más adecuada la funcionalidad amina y dicha funcionalidad puede introducirse haciendo reaccionar el material de ePTFE hidrolizado con aminosilano lineal o ramificado adecuado, aminoalcoxilsilano, aminoalquilsilano, aminoarilsilano. Ejemplos de silanos que pueden usarse son  $\gamma$ -aminopropiltrimetoxisilano,  $\gamma$ -aminopropiltriethoxisilano, N-(beta-aminoetil)- $\gamma$ -aminopropiltrimetoxisilano, N-(beta-aminoetil)- $\gamma$ -aminopropiltriethoxisilano. Dicha funcionalidad amina también puede introducirse a través de dendrímeros acoplados con organosilanos disponibles en compañías tales como Dendritech, Inc. (Midland, MI). Usando este enfoque, a través de selección de organosilanos apropiados, pueden fijarse grupos diferentes grupos funcionales reactivos a los sustratos de ePTFE. Para el mismo grupo funcional, la colocación del grupo funcional desde el sitio de fijación sobre la superficie puede controlarse por el tamaño de la molécula enlazadora usada en el organosilano seleccionado. Ejemplos no limitantes de grupos funcionales reactivos que pueden fijarse son aminas, epóxidos, aldehídos, carboxilos, anhídridos, hidroxilo, acrilatos, metacrilatos, ésteres, tioles, azidas, sulfonatos y fosfonatos por nombrar unos pocos. Si se desea, puede depositarse más de un grupo funcional sobre el sustrato haciendo reaccionar una mezcla de silanos con diferentes grupos organofuncionales con los grupos hidroxilo de la capa intermedia. Los grupos funcionales pueden hacerse reaccionar adicionalmente con otros reactivos químicos para crear la funcionalidad deseada para el uso final específico. Por ejemplo, pueden hacerse reaccionar adicionalmente grupos epóxido con dioles para recrear funcionalidad hidroxilo o grupos funcionales amina pueden reticularse adicionalmente a través del uso de reticulantes basados en maleimida-NHS para crear una funcionalidad que puede reaccionar con biomoléculas que poseen funcionalidad amina tales como anticuerpos.

El tratamiento con silano puede conseguirse tratando el material ePTFE hidrófilo con una solución diluida del silano en un disolvente orgánico a bajo pH. Los detalles de dicho tratamiento con silano y la diversidad de silanos con diferentes grupos organofuncionales y diferente tamaño de enlazador pueden obtenerse del catálogo "Silane Coupling Agents: Connecting Across Boundaries" disponible en Gelest, Inc. de Morrisville, PA. También está disponible información y agentes químicos similares de otras compañías tales como United Chemical Technologies (Bristol, PA), Dow-Corning (Midland, MI), y GE Advanced Materials (Wilton, CT). Para la presente invención, el tratamiento con silano puede conseguirse a través de procedimientos convencionales de recubrimiento con líquido tales como recubrimiento por inmersión, pulverización, recubrimiento por centrifugación, con cepillo, recubrimiento con rodillo, o recubrimiento con barra de Meyer. Como alternativa, el silano puede depositarse sobre la microestructura de membrana a través de recubrimiento en fase de vapor. Debe tenerse cuidado de añadir solamente suficiente del silano para funcionalizar el ePTFE manteniendo al mismo tiempo la porosidad del material.

El procedimiento de la presente invención mejora drásticamente la funcionalidad de una diversidad de membranas como se evidencia por los valores significativamente mejorados de densidad de amina que pueden medirse usando ensayos familiares para los especialistas en la técnica. De forma más remarcable, el ePTFE tratado muestra una mejora muy por encima de un orden de magnitud en la densidad de grupos amina en comparación con materiales de la técnica previa. Las mejoras en las membranas funcionalizadas de esta magnitud fueron sorprendentes e inesperadas.

La densidad de grupos funcionales puede medirse en términos de moles de grupos funcionales por área superficial unitaria del sustrato o por volumen unitario del sustrato. Usando el procedimiento de la invención, se convirtieron materiales porosos con densidad de grupo amino que varía entre 0 y 5 nanomoles/cm<sup>2</sup> en sustratos con densidades de grupos funcionales en el intervalo de 50 a 1.300 nanomoles/cm<sup>2</sup> dependiendo de la naturaleza química específica del material poroso. Dado el grosor de estos sustratos, la densidad funcional por volumen unitario se traduce en 2.500 a 150.000 nanomoles/cm<sup>3</sup>. Por ejemplo, se convirtieron materiales de ePTFE y PP microporosos que estaban desprovistos de cualquier funcionalidad amino en sustratos funcionales amino con densidad funcional amino de 416 y 487 nanomoles/cm<sup>2</sup> usando el procedimiento de la invención. Como el procedimiento de la invención genera sitios funcionales haciendo reaccionar diferentes organosilanos con los grupos hidroxilo depositados durante el recubrimiento de la capa intermedia, los anteriores valores de densidad de grupos funcionales no están limitados solamente a los grupos funcionales amina. En su lugar, se espera que la densidad de sitios funcionales dependa principalmente de la densidad de grupos hidroxilo resultantes del recubrimiento de la capa intermedia. Por lo tanto se prevé a través de elección adecuada de compuestos de silano organofuncionales, puedan conseguirse densidad de sitios funcionales mayor de 50 nanomoles/cm<sup>2</sup> o mayor de 2.500 nanomoles/cm<sup>3</sup> independientemente de la naturaleza específica de los grupos funcionales elegidos.

A parte del uso en aplicaciones de microserie, los sustratos altamente funcionales de la presente invención pueden usarse para unir de forma eficaz y capturar una amplia diversidad de biomoléculas en otras aplicaciones tales como en dispositivos de diagnóstico, aplicaciones de filtración activa, aplicaciones de transferencia, y similares.

Este remarkable aumento en la densidad funcional del sustrato puede conseguirse manteniendo la autofluorescencia bastante baja. Esta combinación de alta densidad funcional y baja autofluorescencia es altamente deseable en un sustrato de microserie ya que maximiza la señal de fluorescencia procedente de las biomoléculas diana hibridadas sobre el ruido de fondo. La autofluorescencia del sustrato puede determinarse explorando el sustrato antes de imprimir las biomoléculas usando escáneres de microserie disponibles en el mercado de varios proveedores tales como Axon Instruments (Union City, CA) y Perkin-Elmer (Wellesley, MA). La exploración puede hacerse a múltiples longitudes de onda de interés, dependiendo del tipo de escáner usado. Los valores promedio de fluorescencia pueden calcularse a las longitudes de onda de interés a partir de los datos del sustrato explorado. Debe apreciarse que la exploración puede realizarse a diferentes configuraciones del instrumento tales como potencia del láser, profundidad focal y ganancia PMT. Las intensidades de señal son una función de estas configuraciones. Por lo tanto, los valores de autofluorescencia deben venir acompañados por la configuración del escáner para un instrumento dado.

Se usó un escáner GenePix 4000A (Axon) para medir la autofluorescencia de los sustratos para la presente invención. La potencia láser y la profundidad focal de éste escáner se fijaron al 100% y 0  $\mu\text{m}$  respectivamente, y todas las mediciones se hicieron a una configuración PMT de 350. Usando el procedimiento de la presente invención, para materiales porosos de baja fluorescencia tales como PTFE, UHMWPE, PP, vidrio, etc.; pueden prepararse sustratos de alta densidad funcional con un nivel de autofluorescencia menor de 1000 unidades relativas de fluorescencia (UFR) y menos de 100 UFR para las longitudes de onda de 532 nm (verde) y 635 nm (rojo), respectivamente. En la mayoría de los casos el nivel de autofluorescencia de dichos sustratos de alta densidad de sitios funcionales puede ser muy inferior, típicamente menos de 100 UFR y 30 UFR a las longitudes de onda de 532 nm y 635 nm, respectivamente.

El sustrato poroso de alta densidad funcional y baja autofluorescencia es más adecuado para aplicaciones de microserie ya que se espera que proporcione una intensidad de señal aumentada sobre el ruido de fondo. Hay varios modos en que pueden usarse dichos sustratos en aplicación de microserie. El sustrato puede usarse tal cual o como alternativa el sustrato puede convertirse en un casete o en la forma de un portaobjeto de microscopio a través de su combinación con otras partes de plástico, cerámicas o metálicas a través de moldeo por inserción u otras técnicas de ensamblaje tales como unión ultrasónica, soldadura por RF, soldadura por calor, o similares. Eligiendo la funcionalidad apropiada, es posible fijar una amplia diversidad de biomoléculas al sustrato de alta densidad de sitios funcionales de la presente invención. Ejemplos no limitantes de biomoléculas que pueden fijarse son ácidos nucleicos, proteínas, péptidos, oligonucleótidos, anticuerpos, células, enzimas, y patógenos, por nombrar unos pocos.

Para muchas aplicaciones, para facilitar tanto la manipulación como la impresión, es deseable dar soporte al sustrato de alta densidad de sitios funcionales de la presente invención con una capa de soporte. Esta capa de soporte puede ser tanto flexible como rígida. La capa de soporte flexible puede ser películas de plástico y láminas metálicas. Sin embargo, para una aplicación tradicional de microserie la capa de soporte es típicamente rígida. Dicha capa de soporte rígida puede estar hecha de un material duro siempre que el material mantenga la estabilidad dimensional a temperaturas de hibridación y no se vea afectado por los reactivos usados durante las etapas de impresión, hibridación, lavado y secado implicadas en un experimento típico de microserie. Ejemplos no limitantes de materiales que son adecuados como capa de soporte son vidrio, metales, cerámica, y plástico. Se usa más habitualmente como capa de soporte un portaobjetos de microscopio de vidrio.

En una realización de la presente invención, el sustrato funcional puede unirse de forma adhesiva, al menos parcialmente, al soporte rígido para crear un sustrato de microserie compuesto. La unión adhesiva resultante debe ser suficientemente fuerte para sobrevivir a las etapas de procesamiento de impresión, hibridación, lavado y secado implicadas en un experimento típico de microserie. El adhesivo por lo tanto tiene que poseer la resistencia térmica y química apropiada. También se desea que el adhesivo muestre un nivel de autofluorescencia lo más bajo posible. Típicamente, los adhesivos que no contienen enlaces conjugados en su estructura química probablemente muestren baja autofluorescencia. El adhesivo elegido debe unirse bien al soporte rígido así como también a la capa porosa funcional. Si fuera necesario, la superficie del soporte puede tratarse para potenciar la unión con el adhesivo. El tratamiento de la superficie del soporte con organosilano es un ejemplo de un tratamiento superficial que puede usarse para potenciar la adhesión. Como alternativa, pueden añadirse aditivos promotores de la adhesión tales como agentes de acoplamiento de silano al adhesivo para promover una mejor unión entre el adhesivo y el soporte rígido. Para una unión aceptable al sustrato poroso funcional, el adhesivo tiene que penetrar en la estructura porosa. Si la viscosidad del adhesivo o la tensión superficial no es suficientemente baja para permitir esta penetración, el adhesivo puede solubilizarse con disolventes de baja viscosidad y/o baja tensión superficial para promover esta penetración. Sin embargo, debe tenerse cuidado para asegurar que el adhesivo no penetra excesivamente en la sección transversal del sustrato funcional ya que esto reduciría la disponibilidad de los grupos funcionales y también aumentaría el nivel de autofluorescencia del sustrato de microserie compuesto.

Pueden usarse diversos tipos de adhesivo. El adhesivo puede ser de naturaleza termoestable. Ejemplos de dichos adhesivos incluyen, aunque sin limitación, epoxis, acrílicos, siliconas. Estos tipos de adhesivos pueden aplicarse a la capa de soporte o la capa funcional, pueden ponerse en contacto con la otra superficie a unir, y después curarse a través de la aplicación de energía en forma de calor, radiación UV o similares. TRA-BOND FDA2 disponible en Tra-Con, Incorporated (Bedford, MA) es un ejemplo de un epoxi termoestable de dos partes que puede usarse. Si el

adhesivo está en forma líquida, puede aplicarse por una diversidad de procedimientos usados habitualmente tales como pulverización, con cepillo, con rodillo, etc. Si el adhesivo está en forma de una película parcialmente curada, puede laminarse a través de la aplicación de presión y/o calor. El adhesivo también puede ser de naturaleza sensible a la presión y pertenecer a diferentes familias químicas. Acrílicos (por ejemplo, cinta de transferencia adhesiva 3M 9461 P de 3M Corporation, St. Paul, MN) y siliconas (por ejemplo, Dow-Corning<sup>®</sup> MD7-4602 de Dow-Corning Corporation, Midland, MI) son adhesivos sensibles a la presión (PSA) habitualmente usados. En este caso, el adhesivo se aplica al soporte o al sustrato funcional y se une al otro material a través de la aplicación de presión y/o calor. Si el adhesivo está en forma líquida, se aplica como se ha indicado anteriormente, se seca si fuera necesario para retirar cualquier volátil y después se une a su equivalente. Finalmente, el adhesivo puede ser termoplástico. Ejemplos de dichos adhesivos con bajas propiedades de fluorescencia son fluoroplásticos (Dyneon<sup>™</sup> THV Fluorothermoplastic de Dyneon LLC, Oakdale, MN); eFEP<sup>™</sup> de Daikin America, Inc., Orangeburg, NY; Teflon<sup>®</sup> FEP (Dupont Fluoroproducts, Wilmington, DE), copolímeros de olefina cíclica Topas<sup>®</sup> de Ticona, Chatham, NJ, por nombrar unos pocos. La forma de película de estos materiales puede usarse para unir la capa funcional a la capa de soporte a través de la aplicación de calor y presión en una etapa de laminación. Si está disponible en forma de resina, el material termoplástico puede disolverse en un disolvente adecuado y aplicarse como una capa delgada sobre la membrana funcional o la capa de soporte, secarse para retirar los volátiles y unirse a su equivalente. La capa de material poroso puede unirse de forma adhesiva al soporte antes de la funcionalización y después el compuesto puede funcionalizarse a través de las etapas de tratamiento hidrófilo y tratamiento con silano como se ha analizado previamente.

La Fig. 1 muestra un artículo 10 de acuerdo con una realización ejemplar de la presente invención. Una capa de soporte 12 tiene un adhesivo 14 dispuesto sobre la misma. Una capa de sustrato de fluoropolímero microporoso, ePTFE, 16 se fija a la capa de soporte 12 mediante el adhesivo 14.

La capa de soporte 12 es cualquier superficie rígida capaz de unirse a la capa de fluoropolímero microporoso 16, con o sin el uso de un adhesivo. Se prefiere vidrio para la capa de soporte 12. La superficie de la capa de soporte 12 se trata opcionalmente antes de aplicar el adhesivo 14 (si se usa) y la capa de fluoropolímero microporoso 16.

Se muestra una micrografía electrónica de barrido de la superficie 20 del material ePTFE en la Fig. 2(A). Esta figura indica la presencia de nodos 22 interconectados por fibrillas 24. La fotomicrografía también representa los poros irregulares de este material.

Se muestra una micrografía electrónica de barrido de la superficie del sustrato poroso de la presente invención usando ePTFE como material de partida en las Fig. 2(A) y 2(B) a dos aumentos diferentes. La microestructura de los materiales ePTFE porosos se trató primero con sol-gel de sílice para crear una capa intermedia que después se hizo reaccionar con un aminosilano. Los nodos recubiertos 26 y las fibrillas recubiertas 28 de la microestructura se muestran en la Fig. 2(C).

Usando el procedimiento de la invención, se prepararon sustratos de microserie compuestos que emplean la capa ePTFE funcional que muestran las características deseadas de densidad de grupos funcionales inusualmente elevada y baja autofluorescencia. En particular, dependiendo de las características del ePTFE, los sustratos compuestos pueden prepararse con densidad de grupos funcionales de al menos 50 nanomoles/cm<sup>2</sup>, preferentemente de al menos 100 nanomoles/cm<sup>2</sup> y mucho más preferentemente de al menos 250 nanomoles/cm<sup>2</sup>. Esto es al menos un orden de magnitud superior que las densidades de grupos funcionales obtenidas para sustratos de la técnica previa. Por ejemplo, dependiendo de las características específicas del material ePTFE usado, las densidades de amina medidas para los sustratos de microserie compuestos varían de aproximadamente 100 a 400 nanomoles/cm<sup>2</sup>. En comparación, las densidades de amina medidas para portaobjetos de vidrio no poroso tratados con aminosilano (Corning Ultragaps<sup>™</sup>) y portaobjetos de microserie Vivid<sup>™</sup> basado en membrana de nailon poroso fueron de aproximadamente 4,8 y 6,5 nanomoles/cm<sup>2</sup> respectivamente.

Aunque se proporciona alta densidad de sitios funcionales, el sustrato de microserie compuesto de la invención mantiene su autofluorescencia a un bajo nivel. La autofluorescencia del sustrato compuesto puede determinarse explorando el compuesto antes de imprimir biomoléculas usando el escáner de microserie GenePix 4000A a una configuración PMT de 350. Usando el procedimiento de la presente invención, puede prepararse un sustrato de microserie compuesto que comprenda una capa de ePTFE funcional con un nivel de autofluorescencia menor de 1.000 unidades relativas de fluorescencia (UFR) y menos de 100 UFR para las longitudes de onda de 532 nm (verde) y de 635 nm, respectivamente. En muchos casos el nivel de autofluorescencia de los sustratos de microserie compuestos puede ser mucho menor, típicamente menos de 200 UFR y 30 UFR a longitudes de onda de 532 nm y de 635 nm, respectivamente.

El sustrato de microserie compuesto de la presente invención proporciona una superficie versátil para la inmovilización de biomoléculas. Diferente a su uso en análisis de microserie típico, el sustrato de la invención puede usarse como sustrato con una diversidad de biomoléculas fijadas al mismo en cualquier patrón arbitrario. Ejemplos de biomoléculas que pueden fijarse son ácidos nucleicos, proteínas, péptidos, oligonucleótidos, anticuerpos, patógenos, por nombrar unos pocos.

El rendimiento del sustrato de microserie compuesto se determinó realizando una evaluación en que se creó una microserie de ADN usando el sustrato compuesto. La microserie después se hibridó con ADNc marcado con dos colorantes fluorescentes, concretamente Cy3 y Cy5, que emiten señales fluorescentes a dos longitudes de onda diferentes. Las señales fluorescentes, a dos longitudes de onda diferentes, de cada mancha (y sus cercanías) dentro de los portaobjetos hibridados después se detectaron un escáner de microserie usando una fuente de luz láser y un tubo fotomultiplicador (PMT) como detector. El escáner detecta las intensidades de luz fluorescente del sustrato de microserie hibridado y los datos se almacenan en forma de una imagen escaneada del sustrato que representa intensidades en una escala de color. Los datos de intensidad de señal sin procesar, obtenidos de este modo, se analizaron estadísticamente usando software de análisis de datos de microserie convencional (tal como GenePix® Pro de Axon Instruments, Genettraffic® de Lobion informatics o Scanarray® Express de Perkin-Elmer) para determinar algunas medidas de rendimiento clave tales como proporción de señal a ruido y nivel de precisión. Estos criterios de rendimiento se determinaron para el sustrato de microserie compuesto de la presente invención así como para sustratos que representan la técnica previa. Están fácilmente disponibles detalles de análisis de datos de microserie en libros tales como "DNA Microarrays", editado por Ulrike A Nuber, Taylor & Francis, NY, 2005 o "Microarray analysis" por Mark Schena, John Wiley & Sons, Hoboken, NY, 2003.

La proporción de señal a ruido (SNR) es una medida de rendimiento clave para un sustrato de microserie. La calidad de la señal desde una mancha dentro de una microserie depende de su intensidad relativa a su entorno inmediato, también conocido como ruido de fondo local. Según se acerca la intensidad de la señal de una mancha a la intensidad del ruido de fondo local, el error en cada medición va siendo potencialmente mayor. A una longitud de onda dada, la SNR para una mancha puede computarse fácilmente determinando primero la intensidad de señal neta, que es la diferencia entre la intensidad de señal media (S) para todos los píxeles que representan una mancha y su fondo local medio (B) para todos los píxeles que representan el área inmediata justo fuera de la mancha. El ruido de fondo (NB) se estima calculando la desviación típica del fondo local. La SNR para la mancha se define como:

$$\text{SNR} = (\text{S}-\text{B})/\text{NB}$$

en la que S, B, y NB se expresan en unidades relativas de fluorescencia (UFR).

Típicamente, la SNR se determina para manchas individuales en una serie. La SNR promedio (ASNR) es el promedio de todas las SNR para manchas individuales en una serie. Usando software de análisis de datos de microserie, pueden realizarse cálculos de SNR automáticamente para una gran cantidad de manchas en una microserie típica.

Siempre se desea elevada ASNR ya que proporciona mayor confianza en la precisión de los datos obtenidos de un experimento de microserie. El sustrato de microserie compuesto de la presente invención proporciona ASNR remarcablemente elevada en comparación con sustratos de la técnica previa. En general, en promedio, el sustrato compuesto de la invención muestra ASNR que es al menos dos veces la obtenida de portaobjetos de vidrio tratados con aminosilano a ambas de onda. Por ejemplo, el rendimiento de una membrana de ePTFE funcionalizada adherida a un portaobjeto de vidrio excede en mucho el de todos los materiales de la técnica previa. Muestra proporciones de señal a ruido promedio para Cy5 y Cy3 de al menos aproximadamente 191 y 94, respectivamente. El portaobjetos de la técnica previa más habitualmente usado muestra proporciones de señal a ruido para Cy5 y Cy3 de aproximadamente 110 y 62, respectivamente.

Fue sorprendente apreciar que el sustrato de microserie compuesto de la presente invención no solamente proporciona elevada ASNR, sino que también era muy eficaz en la estabilización de la señal fluorescente obtenida. Es bien sabido en la técnica que la señal del colorante Cy5 es extremadamente inestable particularmente bajo la influencia de ozono. De hecho, debido a la variación estacional en el nivel de ozono en el ambiente, no es infrecuente observar que la estabilidad de la señal Cy5 se deteriora cuando aumentan los niveles de ozono ambiental. También se ha descubierto ahora que el sustrato de microserie compuesto de la presente invención que emplea una capa de ePTFE funcional es remarcablemente más eficaz en la estabilización de la señal Cy5 en comparación con lo observado sobre sustratos de la técnica previa. Por ejemplo, en los meses de verano cuando los niveles de ozono ambiental son elevados, la SNR Cy5 para el sustrato de la invención era aproximadamente 7,7 veces el de la SNR Cy5 en portaobjetos de vidrio tratado con aminosilano y esta proporción. En 24 horas, esta proporción aumentó hasta 38,9 ya que la señal Cy5 sobre el portaobjetos de vidrio se redujo drásticamente mientras que la señal Cy5 era relativamente más estable sobre el sustrato compuesto de la presente invención.

Además de la elevada SNR, la precisión es otra medida del rendimiento que es muy deseable. En un experimento de microserie, cuando la misma diana está marcada con dos diferentes colorantes fluorescentes (Cy3 y Cy5); se espera que las señales ambas longitudes de onda proporcionen la misma información. En otras palabras, si la intensidad de la señal Cy3 se representa frente a la intensidad de la señal Cy5 en un gráfico con idénticos ejes X e Y, los datos ideales deben caer sobre la línea 1:1 (o 45 grados). En realidad, los datos generalmente derivan de esta línea y cuanto mayor es la desviación desde la línea 1:1, menos fiables se convierten los datos. Una medida de la precisión de los datos puede obtenerse ideando una medida de la cercanía de los datos a la línea 1:1. Si hay una cantidad M de datos puntuales y fuera de ese conjunto si los datos puntuales N caen fuera de los límites superior de factor Z e inferior de factor Z, el nivel de precisión de factor Z puede definirse como

$$P_z = \text{factor-Z nivel de precisión \%} = 100 \times (1 - (N/M))$$

5 en la que los límites superior de factor Z e inferior de factor Z representan las relaciones donde la intensidad de señal Cy3 es Z veces o 1/Z veces la intensidad de señal Cy5 respectivamente. Por ejemplo, 2 veces superior implica que la intensidad de señal Cy3 es 2 veces la intensidad de señal Cy5 y 2 veces inferior implica que la intensidad de señal Cy3 es la mitad de la intensidad de señal Cy5. Valores  $P_z$  superiores a niveles Z inferiores indican datos más precisos y fiables. El sustrato de microserie compuesto de la presente invención muestra un nivel de precisión remarcablemente elevado. Típicamente,  $P_{1,5}$  y  $P_{1,2}$  eran al menos el 99% y al menos el 90%, respectivamente, para los sustratos de la presente invención. En comparación, los valores respectivos para portaobjetos de vidrio tratado con aminosilano eran del 96 y el 73%, respectivamente. Claramente, el sustrato compuesto descrito aquí produce datos extremadamente precisos y fiables cuando se usa en un experimento de microserie.

### Ejemplos

Procedimientos de ensayo

Medición del grosor

15 El grosor de membrana se midió colocando la membrana entre las dos placas de un espesímetro de mordaza Kafer FZ1000/30 (Kafer Messuhrenfabrik GmbH, Villingen-Schwenningen, Alemania). Se usó el promedio de las tres mediciones.

Medición del punto de burbujeo

20 El punto de burbujeo y el tamaño de poro de flujo medio se midieron de acuerdo con los contenidos generales de ASTM F31 6-03 usando un porómetro de flujo capilar (Modelo CFP 1500 AEXL, Porous Materials Inc., Ithaca, NY). Se colocó la membrana de muestra en la cámara de muestra y se humedeció con fluido de silicona SiWick (Porous Materials Inc., Ithaca, NY) que tiene una tensión superficial de  $19,1 \times 10^{-5}$  N/cm. La pinza inferior de la cámara de muestra tenía un inserto de disco metálico poroso de 2,54 cm de diámetro, un grosor de 3,175 mm (disco de metal poroso de 40 micrómetros, Mott Metallurgical, Farmington, CT,) y la pinza superior de la cámara de muestra tenía un orificio con diámetro de 3,175 mm. Usando el software Capwin (versión 6.62.1) se establecieron los siguientes parámetros como especificados en la tabla inmediatamente a continuación. Los valores presentados para el punto de burbujeo y el tamaño de poro de flujo medio fueron el promedio de dos mediciones.

Parámetro	Punto de referencia	Parámetro	Punto de referencia
flujo máx.(cm <sup>3</sup> /m)	200000	tiempo eq mín. (s)	30
flujo burb.(cm <sup>3</sup> /m)	100	salto de presión (cts)	10
F/PT (antiguo tiempo burb.)	40	salto de flujo (cts)	50
pres. bp mín. (PSI)	0	eqiter	3
tiempo cero (s)	1	aveiter	20
v2incr (cts)	10	dif p máx. (PSI)	0,1
preginc (cts)	1	dif f máx. (cm <sup>3</sup> /m)	50
retardo de pulso (s)	2	p inicial (PSI)	1
pres. máx. (PSI)	500	f inicial (cm <sup>3</sup> /m)	500
anchura de pulso (s)	0,2		

Medición de densidad de grupos funcionales

30 Se usó un ensayo basado en ninhidrina para determinar la densidad de los grupos amino funcionales. El ensayo se basó en los contenidos de Sarin y col. (Sarin, V.K., Kent, S.B.H., Tam, J.P. y Merrifield, R.B. (1981) Anal. Biochem. 117, 147-157). En este ensayo, se hizo reaccionar ninhidrina con los sustratos de la presente invención. El producto de reacción dentro del líquido resultante se determinó espectroscópicamente para llegar a la concentración de funcionalidad amina. El ensayo usó muestras de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> de tamaño obtenidas de los sustratos de muestra y se empleó el siguiente procedimiento:

35 Reactivo A - En un vaso de precipitados, se mezclaron 40 g de fenol y 10 ml de etanol absoluto y se calentaron hasta que se obtuvo un líquido transparente. En un vaso de precipitados diferente, se disolvieron 0,042 g de cianuro potásico (KCN) en 65 ml de agua. Después se diluyeron aproximadamente 2 ml de esta solución de KCN con 100 ml de piridina absoluta en un frasco diferente. En un recipiente diferente marcado "Reactivo A", se mezclaron 6 ml de la solución de fenol/etanol con 12,5 ml de la solución de KCN/piridina.

40 Reactivo B - Se disolvieron 2,5 g de ninhidrina en 10 ml de etanol absoluto.

## Análisis de muestras

5 En un tubo de ensayo, se añadieron 800  $\mu\text{l}$  de Reactivo A y 200  $\mu\text{l}$  de Reactivo B. El tubo de ensayo se colocó en un bloque térmico configurado a 100°C y el bloque se colocó sobre un agitador. El agitador se hizo funcionar a 110 rpm durante 10 min. El tubo de ensayo después se retiró y se colocó en un baño de agua. Se añadió etanol al tubo hasta que el volumen total fue de 2 ml y la solución se mezcló bien. Se pipetearon alícuotas de 200  $\mu\text{l}$  de esta mezcla en una placa de vidrio de 96 pocillos y se midió la absorbancia a 570 nm usando un espectrofotómetro.

## Análisis de datos

La densidad de amina para cada muestra se calculó a partir de la siguiente relación usando el valor de absorbancia después de sustraer la absorbancia del blanco.

$$10 \quad \text{Densidad de amina (nanomoles/cm}^2\text{)} = \frac{[\text{Absorbancia}_{\text{muestra}} * \text{Volumen (l)} * 10^9 \text{ (nmol/mol)}]}{[\text{Co.Ext.}_{570} \text{ (M}^{-1} \text{ cm}^{-1}) * \text{Longitud de paso (cm)} * \text{Área}_{\text{muestra}} \text{ (cm}^2\text{)}],}$$

en que Volumen = 2 ml=0,002 l, Co. Ext. = Coeficiente de extinción = 15.000  $\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , y la longitud de paso usada fue 0,4146 cm.

15 Para cada muestra, se hicieron tres mediciones y el valor de densidad de amina se presentó como el promedio de las tres réplicas.

En el caso de sustratos funcionales no admitidos, se midió directamente el grosor del sustrato. En este caso, la densidad de grupos funcionales se expresó como:

$$20 \quad \text{Densidad de grupos funcionales (nanomoles/cm}^3\text{)} = \text{densidad de grupos funcionales (nanomoles/cm}^2\text{)/grosor de sustrato (cm)}$$

## Medición de auto-fluorescencia

25 La auto-fluorescencia de los sustratos no admitidos y los portaobjetos de microserie preparados con estos sustratos funcionalizados se midió usando un escáner Axon Genepix 4000A (Axon Instruments Inc., Union City, CA) con una configuración PMT de 350 y una resolución de 10  $\mu\text{m}$ . La auto-fluorescencia se midió a longitudes de onda de 635 nm y 532 nm. Las muestras de portaobjetos (incluyendo sustratos Vycor rígidos) se colocaron en el soporte de portaobjetos con el sustrato enfocando hacia abajo y se exploraron para la auto-fluorescencia. En el caso de sustratos no admitidos tales como membranas, las muestras se cubrieron alrededor de un portaobjetos de microscopio de vidrio liso y se colocaron en el soporte de portaobjetos con el sustrato enfocando hacia abajo y se exploraron para la auto-fluorescencia. La imagen explorada se analizó usando el software GenePix Pro 5.0. Los valores de auto-fluorescencia se registraron en 4.800 localizaciones concretas dentro del portaobjetos sobre un área rectangular. La esquina izquierda superior de esta área estaba 2,27 mm del borde izquierdo y 12,21 mm del borde superior de la muestra de 25,4 mm x 76,2 mm. La esquina derecha inferior de esta área estaba 18,04 mm del borde izquierdo y 59,82 mm del borde inferior de la muestra. Los valores promedio de auto-fluorescencia a las dos longitudes de onda se presentaron para cada portaobjetos de muestra y cada sustrato.

## 35 Medición de señal a ruido

40 Las mediciones de señal a ruido de los portaobjetos de microserie para la presente invención se realizaron por el Micro-array Centre at University Health Network (UHN), Toronto, Canadá. Se imprimió un conjunto clonal 1718 del genoma humano en el portaobjetos usando una solución de impresión del ADN en SSC 3x a una concentración de 0:2  $\mu\text{g/ml}$ . La serie impresa se organizó en 32 bloques dispuestos en 8 filas y 4 columnas con una distancia de cuadrícula a cuadrícula de 4.500  $\mu\text{m}$ . En cada cuadrícula, había 120 elementos dispuestos en 10 filas y 12 columnas. El tamaño del elemento era de 100  $\mu\text{m}$  y la distancia de un elemento a otro elemento era de 200  $\mu\text{m}$ . El nivel de humedad durante la impresión se controló entre el 55-60%. Después de la impresión, las sondas impresas en el portaobjetos se secaron a 95°C durante 1 minuto y después se reticularon a 2500 micro Julios de energía usando un UV StratalinkerTM 1800 (Stratagene).

45 Se usó el siguiente protocolo de marcaje para generar ADNc marcado a partir de 10  $\mu\text{g}$  de ARN total.

## Transcripción inversa

- En un tubo de 0,5  $\mu\text{l}$ , se combinan 8,0  $\mu\text{l}$  de tampón de primera hebra 5X (Superscript II, Invitrogen), 1,5  $\mu\text{l}$  de cebador AncT (5'-T<sub>20</sub>VN, 100 pmol/ $\mu\text{l}$ ), 3,0  $\mu\text{l}$  de dNTP-dTTP (6,67 mM cada uno de dATP, dCTP, dGTP), 3,0  $\mu\text{l}$  de dTTP 2 mM, 3,0  $\mu\text{l}$  de AA-dUTP 2 mM (Sigma, n° catálogo A-0410), 4,0  $\mu\text{l}$  de DTT 0,1 M, 1,0  $\mu\text{l}$  de ARN de control (transcritos artificiales de Arabidopsis (2-10 ng/ $\mu\text{l}$ ), opcional), 0,1-10  $\mu\text{g}$  de ARN total (0,1-0,5  $\mu\text{g}$  de ARNm o 5-10  $\mu\text{g}$  de ARN total), y 40  $\mu\text{l}$  de agua libre de nucleasa.
- Se incubó la reacción de marcaje a 65°C durante 5 minutos, después a 42°C durante 2 minutos (para enfriar parcialmente la solución). No es necesario que la incubación suceda en la oscuridad.

- Se añaden 2 µl de transcriptasa inversa (Superscript II, Invitrogen) y se incuba a 42°C durante 2 horas.
- Se añaden 8 µl de hidróxido sódico 1 M y se calienta a 65°C durante 15 minutos para hidrolizar el ARN.
- Se añaden 8 µl de ácido clorhídrico 1 M y 4 µl de tris-HCl 1 M, pH 7,5 para neutralizar la solución.

#### Purificación de amino alil-ADNc

5 La purificación se realizó usando el kit de purificación CyScribe™ GFX™ (GE Amersham, nº catálogo 27-9606-02). Cada muestra se purificó en una columna GFX, usando el siguiente protocolo.

- Se añaden 500 µl de tampón de captura a cada columna.
- Se transfiere producto de ADNc (aproximadamente 62 µl) a la columna, se pipetea arriba y abajo varias veces para mezclar, se centrifuga a 13.800xg durante 30 segundos y se desecha el flujo continuo.
- 10 • Se añaden 600 µl de etanol al 80% y se centrifugan a 1.300 rpm durante 30 segundos y se desecha el flujo continuo; se repite esta etapa para un total de 3 lavados.
- Se centrifuga la columna durante 30 segundos adicionales para asegurar que se retira todo el etanol.
- Se transfiere la columna GFX a un tubo fresco y se añaden 60 µl de bicarbonato sódico 0,017 M, pH 9.
- Se incuba la columna GFX a temperatura ambiente durante 1 minuto.
- 15 • Se centrifuga a 13.800xg durante 1 minuto para eluir el ADNc marcado purificado.
- Se usa Speed Vac para secar completamente la muestra. Se resuspende en 7 µl de agua libre de nucleasa.

#### Preparación de colorante de cianuro reactivo monofuncional y marcaje

- Se usaron Alexa 647 / Alexa 555 flúor (Invitrogen) y Cy5/Cy3 (Amersham) en este estudio y ambos se mencionan como Cy5 y Cy3 respectivamente. Los Alexa flúor se venden individualmente envasados. Se añaden 3 µl de DMSO por tubo para resuspender el colorante. Se añaden los contenidos completos del tubo a cada reacción de marcaje. Los colorantes Cy vienen en envases de 5 µl. Se añaden 45 µl de DMSO a cada tubo. De nuevo, se añaden 3 µl del colorante resuspendido a cada reacción de marcaje.
- Se añaden 3 µl de colorante a 7 µl de aminoalil-ADNc marcado, se mezclan pipeteando arriba y abajo, y se incuban en la oscuridad a temperatura ambiente durante 1 hora.
- 25 • Se añaden 4,5 µl de hidroxilamina 4 M para inactivar el colorante no conjugado. Se incuban en la oscuridad a temperatura ambiente durante 15 minutos.

#### Purificación de sonda marcada fluorescente

- Se añaden 35 µl de agua a cada reacción para llevar cada volumen de reacción a aproximadamente 50 µl.
- Se combinan las muestras marcadas con Cy5 y Cy3 que co-hibridarán.
- 30 • Se añaden 500 µl de tampón de captura a cada columna.
- Se transfiere el producto de ADNc marcado (aproximadamente 100 µl) a la columna, se pipetea arriba y abajo varias veces para mezclar, se centrifuga a 13.800xg durante 30 segundos y se desecha el flujo continuo.
- Se añaden 600 µl de etanol al 80% y se centrifugan a 13.800xg durante 30 segundos y se desecha el flujo continuo; se repite esta etapa para un total de 3 lavados.
- 35 • Se centrifuga la columna durante 30 segundos adicionales para asegurar que se retira todo el etanol.
- Se transfiere la columna GFX a un tubo fresco y se añaden 60 µl de tampón de elución (proporcionado con el kit).
- Se incuba la columna GFX a temperatura ambiente durante 1 minuto.
- Se centrifuga a 13.800xg durante 1 minuto para eluir el ADN marcado con flúor purificado.
- 40 • La muestra se somete a SpeedVac hasta sequedad (en elevado calor; tener cuidado de no secar en exceso) y se resuspende en 5 µl de agua libre de nucleasa.

#### Hibridación

- No se requiere una etapa de prehibridación.
- Se hace suficiente solución para todas las hibridaciones - se hacen 100 µl por portaobjetos y 100 µl adicionales para errores de pipeteo.
- 45 • A cada 100 µl de solución DIG Easy Hyb (Roche), se añaden 5 µl de ARNt de levadura (Invitrogen; 10 mg/ml) y 5 µl de ADN de timo de ternera (Sigma; 10 mg/ml). Se incuba la mezcla a 65°C durante 2 minutos y se enfría hasta temperatura ambiente.
- Se añaden 100 µl de la solución de hibridación preparada a cada par combinado de ADNc marcado con Cy5 y Cy3 (aproximadamente 5 µl).
- 50 • Se mezcla la solución de hibridación con el ADNc marcado, se incuba a 65°C durante 2 minutos, y se enfría hasta temperatura ambiente.
- Se coloca el cubreobjetos (24x60 mm, no cubreobjetos lifterslip) sobre una superficie fiable (la esquina de una caja de puntas funciona bien) y se pipetea la mezcla de hibridación sobre el cubreobjetos. Se deja el portaobjetos con "el lado de serie" hacia abajo sobre la parte superior del cubreobjetos (realmente no se pone el portaobjetos hacia abajo sobre el cubreobjetos, simplemente se mantiene sobre la parte superior del cubreobjetos hasta que el portaobjetos se humedece suficiente para captar el cubreobjetos). Se invierte rápidamente el portaobjetos, con el cubreobjetos adherido al mismo, de modo que el cubreobjetos queda en
- 55

la parte superior del portaobjetos.

- Se coloca cuidadosamente el o los portaobjetos en la cámara o cámaras de hibridación. Las cámaras de hibridación que se usan son cajas de plástico de portaobjetos de microscopio que contienen una pequeña cantidad de solución DIG Easy Hyb en el fondo (para mantener el entorno húmedo). Los portaobjetos lisos de microscopio limpios se colocan en cada segunda o tercera posición de portaobjetos en la caja de portaobjetos para crear carriles o una plataforma sobre la cual pueden colocarse las series de hibridación. Cada cámara de hibridación puede mantener dos o tres portaobjetos de hibridación (dependiendo de que la dirección en que se coloquen los portaobjetos). La tapa se coloca cuidadosamente sobre la caja y después se envuelve la caja con envoltorio de plástico.
- Se incubó sobre una superficie a nivel en una incubadora de 37°C durante una noche (aproximadamente 16-18 horas)

#### Lavado

- Se retira el cubreobjetos sumergiendo rápida pero suavemente la serie en SSC 1X (dejar que el cubreobjetos se deslice suavemente; sujetar el portaobjetos en el extremo del código de barras con fórceps). Se coloca el portaobjetos en una rejilla de tinción y se coloca en una placa de tinción (Evergreen Scientific a través de Diamed nº cat. E/S258-4100-000) con SSC 1X fresco.
- Cuando todas las series se han retirado de las cámaras de hibridación, se lavan durante 3 series de 15 minutos cada una a 50°C en cajas de tinción de portaobjetos limpias que contienen SSC 1X/SDS al 0,1% precalentado (a 50°C) con agitación ocasional suave.
- Después de completarse lo lavados, se aclaran los portaobjetos dos veces en SSC 1X a temperatura ambiente (sumergiendo 4-6 veces) y después en SSC 0,1X.
- Se centrifugan los portaobjetos secos a 89xg durante 5 minutos en una caja de portaobjetos revestida con papel Whatman. Como alternativa, los portaobjetos pueden secarse en un tubo Falcon de 50 ml (y centrifugarse a 89xg durante 5 min).
- Las series deben almacenarse en la oscuridad. Se recomienda que las series se exploren lo más pronto posible después de haberse lavado (al menos en dos días). Los portaobjetos hibridados de la presente invención se exploraron usando el escáner Scanarray™ 4000 (Perkin Elmer, Wellesly, MA) a una configuración de potencia de láser que variaba entre 65-75 y una configuración PMT que variaba de 50-55.

Las imágenes TIFF se cuantificaron usando ArrayVision v.8.0 (Imaging Research Inc.). Los datos data y las imágenes después se cargaron en GeneTraffic™ (Lobion Informatics) para la normalización. Se eligió el procedimiento "Lowess, sub-cuadrícula" para la normalización en GeneTraffic™. Los valores normalizados de intensidad se descargaron de la base de datos GeneTraffic™. La S/N promedio se calculó en Excel para cada tipo de portaobjetos. La desviación típica para cada réplica se calculó en Excel para cada tipo de portaobjetos. Cada marcha aparece dos veces en cada serie de modo que incluso cuando solamente se ensayaba una serie había 2 réplicas para calcular la desviación típica de la S/N entre ellas. Cuando se usaron más series, la desviación típica de S/N se calculó a través de las series replicadas y las machas replicadas (2 por serie).

La proporción de señal a ruido también se midió para portaobjetos Ultragaps de Corning Life Sciences. El procedimiento fue idéntico al mencionado anteriormente excepto que se usó menos (80 µl) tampón de hibridación. Además, la exploración se realizó en una configuración diferente que se determinó como óptima para estos portaobjetos. Específicamente, la configuración de potencia láser usada varió entre 95 a 100 y la configuración PMT varió de 70-80.

#### Nivel de precisión

Las mediciones del nivel de precisión se realizaron usando series que se marcaron con la misma muestra de ARN en los dos canales Cy5 y Cy3. De forma ideal, todos los datos puntuales caerían exactamente en una línea de 45° dibujada a través del origen en un diagrama de dispersión de intensidad normalizada de señal Cy3 frente a intensidad normalizada de señal Cy5 sobre un diagrama log-log para todos los datos puntuales (M) sobre el portaobjetos. A partir de este diagrama, se determinó la cantidad de datos puntuales (N) que caen fuera de los límites superior de factor Z e inferior de factor Z. La consistencia o especificidad o nivel de precisión se define como

$$\text{factor Z nivel de precisión, \%} = 100 \times (1 - (N/M))$$

#### 50 Ejemplos de sustrato funcionalizado

##### Solución de sol-gel

Se preparó una solución precursora permitiendo que 40,7 partes de tetraetoxisilano (Dynasil A fabricado por Degussa Corporation, Parsippany, NJ), 14,1 partes de agua desionizada, 44,8 partes de etanol y 0,4 partes de ácido clorhídrico (37%) reaccionaran durante 24 horas a 65°C. La solución después se enfrió y almacenó en un congelador hasta su uso adicional.

## Solución de silano

Se preparó una solución de silano mezclando 2 partes de aminopropiltrietoxisilano (A0750, United Chemical Technologies, Bristol, PA) a 98 partes de una mezcla de etanol/agua 95/5 (p/p). Esta solución se preparó justo antes de usar y se dejó en reposo durante al menos 5 minutos antes de su uso.

5 **Ejemplo 1**

Este ejemplo describe un sustrato microporoso altamente funcional de la presente invención obtenido partiendo con ePTFE como material poroso. Las sorprendentes ventajas del procedimiento y los artículos de la presente invención son evidentes cuando se examina la mejora sustancial de las membranas tratadas frente a las no tratadas.

Tipo de material: ePTFE

10 **Membrana**

Se obtuvo una membrana de politetrafluoroetileno expandido (ePTFE) preparada de acuerdo con los contenidos de la patente de Estados Unidos 4.187.390. La membrana de ePTFE era de aproximadamente 74  $\mu$  de grosor y tenía un punto de burbujeo de aproximadamente 0,434 MPa. La formación de gotas de agua sobre la superficie de la membrana puso de manifiesto su hidrofobicidad.

15 **Tratamiento sol-gel**

La membrana de ePTFE se trató montando la membrana en bastidores de bordado para facilitar la manipulación y después sumergiendo la membrana en una solución obtenida por dilución de la solución sol-gel con cantidades iguales de etanol en peso. Después de 5 minutos, la membrana se retiró y se sumergió en agua desionizada durante 5 minutos. Después de la etapa de aclarado, la membrana se secó al aire y después se calentó a 150°C durante 5 minutos. En esta fase la membrana era hidrófila y el agua humedeció fácilmente la membrana.

20

Tratamiento con aminosilano

La membrana hidrófila se trató adicionalmente con aminosilano para proporcionar grupos amino funcionales sobre su microestructura. Esto se consiguió sumergiendo la membrana en la solución de silano durante 5 minutos, después aclarándola en alcohol isopropílico (IPA) durante 2 minutos y calentando la membrana a 110°C durante 10 minutos. La membrana se trató de nuevo con silano repitiendo las etapas idénticas de inmersión de 5 minutos en solución de silano, aclarado de 2 minutos en IPA y calentamiento a 110°C durante 10 minutos.

25

Membrana final

La membrana de ePTFE funcionalizada final era de 34  $\mu$ m de grosor y un ensayo de ninhidrina indicó que la densidad de amina era de 416,4 nanomoles/cm<sup>2</sup> (o 121.435 nanomoles/cm<sup>3</sup>). La auto-fluorescencia de la membrana de ePTFE funcionalizada se midió como 21,2 y 30,4 respectivamente a 635 nm y 532 nm. Con fines comparativos, se ensayó una membrana de ePTFE idéntica pero no tratada para la presencia de cualquier grupo amino funcional usando el ensayo de ninhidrina; no se detectaron grupos amino.

30

**Ejemplo 2**

Este ejemplo también describe un sustrato microporoso altamente funcional de la presente invención obtenido partiendo con ePTFE como material poroso. Se repitió el Ejemplo 1 excepto que se sustituyó el sol-gel por PVOH. De nuevo, el artículo de la presente invención funcionó mucho mejor que la membrana no tratada del mismo tipo que el descrito en el Ejemplo 1.

35

Tipo de material: ePTFE

Tratamiento con PVOH

La membrana de ePTFE usada en el Ejemplo 1 se trató montando la membrana en un bastidor de bordado para facilitar la manipulación y después sumergiendo la membrana en IPA durante 5 minutos, después en agua desionizada durante 2 minutos, después en solución acuosa al 5% en peso de alcohol polivinílico (P1180, Spectrum Chemicals, Gardena, CA) durante 10 minutos. La membrana se retiró y sumergió en agua desionizada durante 10 minutos. Después de la etapa de aclarado, la membrana se secó al aire durante una noche en condiciones ambientales y después se calentó a 110°C durante 10 minutos. En esta fase la membrana era hidrófila y el agua humedeció fácilmente la membrana.

40

45

Tratamiento con aminosilano

La membrana hidrófila se trató adicionalmente con aminosilano para proporcionar grupos amino funcionales sobre su microestructura. Esto se consiguió sumergiendo la membrana en la solución de silano durante 5 minutos, después aclarando en alcohol isopropílico (IPA) durante 2 minutos y calentando la membrana a 110°C durante 10

50

minutos. La membrana se trató de nuevo con silano repitiendo las etapas idénticas de inmersión de 5 minutos en solución de silano, aclarado de 2 minutos en IPA y calentamiento a 110°C durante 10 minutos.

Membrana final

5 La membrana resultante se ensayó usando el ensayo de ninhidrina y se detectó que la densidad promedio de los grupos amino funcionales era de 118,5 nanomoles/cm<sup>2</sup>.

### Ejemplo comparativo 3

10 Este ejemplo describe un sustrato microporoso altamente funcional de la presente invención obtenido partiendo con nylon microporoso como material poroso. Las sorprendentes ventajas del procedimiento y los artículos de la presente invención son evidentes cuando se examina la mejora sustancial de las membranas tratadas frente a las no tratadas.

Tipo de material: nylon microporoso

Membrana

Se obtuvo una membrana comercial de nylon microporoso con tratamiento superficial (Hybond N+) de Amersham Biosciences Corp., Piscataway, NJ.

15 La membrana era aproximadamente de 150 μm de grosor y tenía un punto de burbujeo de aproximadamente 0,09 MPa. El ensayo de ninhidrina indicó que la densidad de grupos amino funcionales de la membrana obtenida del proveedor era de 9,7 nanomoles/cm<sup>2</sup> (o 638 nanomoles/cm<sup>3</sup>).

Tratamiento sol-gel y tratamiento con aminosilano

La membrana se funcionalizó usando las etapas resumidas en el Ejemplo 1.

20 Membrana final

La membrana resultante era de aproximadamente 147 μm de grosor y poseía una densidad de grupos funcionales de 1.093 nanomoles/cm<sup>2</sup> (74.199 nanomoles/cm<sup>3</sup>). Este marcado aumento en la densidad de grupos amino funcionales fue una consecuencia del procedimiento de la presente invención.

### Ejemplo comparativo 4

25 Este ejemplo describe un sustrato microporoso altamente funcional de la presente invención obtenido partiendo con una lámina porosa de polietileno de peso molecular ultra-alto (UHMWPE) como material poroso. Las sorprendentes ventajas del procedimiento y los artículos de la presente invención son evidentes cuando se examina la mejora sustancial de las membranas tratadas frente a las no tratadas.

Tipo de material: UHMWPE poroso

30 Membrana

Se obtuvo una lámina comercial porosa de UHMWPE (Porex 9619) de Porex Corporation, Fairburn, GA. La lámina era de aproximadamente 1.524 μm de grosor y su punto de burbujeo se determinó en aproximadamente 0,009 MPa.

Tratamiento sol-gel y tratamiento con aminosilano

La lámina porosa se funcionalizó usando las etapas resumidas en el Ejemplo 1.

35 Membrana final

40 La lámina resultante era de aproximadamente 1.524 μm de grosor y la densidad de grupos funcionales fue de 426,9 nanomoles/cm<sup>2</sup> (2.801 nanomoles/cm<sup>3</sup>). La auto-fluorescencia de la lámina de UHMWPE funcionalizado se midió como 31,1 y 107,2 UFR respectivamente a 635nm y 532 nm. Con fines comparativos, se ensayó la lámina de UHMWPE porosa obtenida en el mercado para la presencia de cualquier grupo amino funcional usando el ensayo de ninhidrina. El ensayo indicó que la densidad de grupos amino funcionales de la membrana era de 1,1 nanomoles/cm<sup>2</sup> (o 7,0 nanomoles/cm<sup>3</sup>). La auto-fluorescencia de la lámina de UHMWPE disponible en el mercado se midió como 23,9 y 48,7 UFR respectivamente a 635 nm y 532 nm. Este marcado aumento en la densidad de grupos amino funcionales sin aumentar significativamente el nivel de auto-fluorescencia se debió al procedimiento de la presente invención.

45

**Ejemplo comparativo 5**

5 Este ejemplo describe un sustrato microporoso altamente funcional de la presente invención obtenido partiendo con polipropileno microporoso como material poroso. Las sorprendentes ventajas del procedimiento y los artículos de la presente invención son evidentes cuando se examina la mejora sustancial de las membranas de polipropileno microporoso tratadas frente a las de la técnica previa.

Tipo de material: polipropileno microporoso

Membrana

10 Se obtuvo una membrana comercial de polipropileno microporoso (Polysep, 0,1  $\mu$ , nº catálogo M01WP320F5) de GE Osmonics Inc., Watertown, MA. La membrana era de aproximadamente 86  $\mu$  de grosor y su punto de burbujeo se determinó en aproximadamente 0,135 MPa.

Tratamiento sol-gel y tratamiento con aminosilano

La membrana se funcionalizó usando las etapas resumidas en el Ejemplo 1.

Membrana final

15 La membrana resultante era de aproximadamente 74  $\mu$ m de grosor y la densidad de grupos funcionales era ahora de 486,8 nanomoles/cm<sup>2</sup> (66.087 nanomoles/cm<sup>3</sup>). Con fines comparativos, se ensayó la membrana de polipropileno microporoso obtenida en el mercado para la presencia de cualquier grupo amino funcional usando el ensayo de ninhidrina. El ensayo no pudo detectar ningún grupo amino funcional sobre esta membrana.

**Ejemplo comparativo 6**

20 Este ejemplo describe un sustrato microporoso altamente funcional de la presente invención obtenido partiendo con PTFE poroso como material poroso. Las sorprendentes ventajas del procedimiento y los artículos de la presente invención son evidentes cuando se examina la mejora sustancial de las membranas tratadas frente a las no tratadas.

Tipo de material: PTFE poroso

Membrana

25 Se obtuvo una membrana comercial de politetrafluoroetileno (PTFE) poroso (Mupor PM17Y) de Porex Corporation, Fairburn, GA. La membrana era de aproximadamente 152  $\mu$ m de grosor y su punto de burbujeo se determinó en aproximadamente 0,044 MPa.

Tratamiento sol-gel y tratamiento con aminosilano

La membrana porosa se funcionalizó usando las etapas resumidas en el Ejemplo 1.

Membrana final

30 La membrana resultante era de aproximadamente 152  $\mu$ m de grosor y la densidad de grupos funcionales era ahora de 78,6 nanomoles/cm<sup>2</sup> (5.158 nanomoles/cm<sup>3</sup>). No se realizó ensayo de ninhidrina sobre la membrana no tratada ya que no se esperaba que hubiera grupos amino funcionales presentes.

**Ejemplo comparativo 7**

35 Este ejemplo describe un sustrato microporoso altamente funcional de la presente invención obtenido partiendo con fluoruro de polivinilideno microporoso como material poroso. Las sorprendentes ventajas del procedimiento y los artículos de la presente invención son evidentes cuando se examina la mejora sustancial de las membranas tratadas frente a las no tratadas.

Tipo de material: membrana de fluoruro de polivinilideno microporoso

Membrana

40 Se obtuvo una membrana comercial de fluoruro de polivinilideno microporoso (membrana PVDF-Plus Transfer, 0,22  $\mu$ , nº catálogo PV2HY320F5) de GE Osmonics Inc., Watertown, MA. La membrana era de aproximadamente 152  $\mu$  de grosor y su punto de burbujeo se determinó en aproximadamente 0,135 MPa.

Tratamiento sol-gel y tratamiento con aminosilano

La membrana se funcionalizó usando las etapas resumidas en el Ejemplo 1.

45

Membrana final

5 La membrana resultante era de aproximadamente 154  $\mu\text{m}$  de grosor y la densidad de grupos funcionales era ahora de 420,6 nanomoles/ $\text{cm}^2$  (27.146 nanomoles/ $\text{cm}^3$ ). La auto-fluorescencia de la membrana de PVDF funcionalizada se midió como 173,4 y 526,5 UFR respectivamente a 635nm y 532 nm. No se realizó ensayo de ninhidrina sobre la membrana no tratada ya que no se esperaba que hubiera grupos amino funcionales presentes. La auto-fluorescencia de la membrana de PVDF no tratada se midió como 36,6 y 58,2 UFR respectivamente a 635 nm y 532 nm.

**Ejemplo comparativo 8**

10 Este ejemplo describe un sustrato microporoso altamente funcional de la presente invención obtenido partiendo con vidrio poroso como material poroso. Este ejemplo describe el uso de vidrio poroso como sustrato. Las sorprendentes ventajas del procedimiento y los artículos de la presente invención son evidentes cuando se examina la mejora sustancial de los sustratos tratados frente a los no tratados.

Tipo de material: vidrio poroso

Sustrato

15 Se obtuvieron portaobjetos rectangulares de 25,4 mm x 76,2 mm x 1 mm de grosor fabricados hechos de vidrio poroso Vycor 7930 de Advanced Glass & Ceramics, Holden, MA.

Tratamiento con aminosilano

Siguiendo los contenidos de la técnica previa, el portaobjetos de vidrio poroso se funcionalizó usando justo las etapas de tratamiento con silano especificadas en el Ejemplo 1.

20 Tratamiento sol-gel y tratamiento con aminosilano

También se funcionalizó otra muestra del portaobjetos de vidrio poroso usando ambas etapas de sol-gel y aminosilano resumidas en el Ejemplo 1.

Sustratos finales

25 El portaobjetos que se trató solamente con silano mostró una densidad de grupos amino de 1.169,6 nanomoles/ $\text{cm}^2$  (o 12.118 nanomoles/ $\text{cm}^3$ ) y los niveles de auto-fluorescencia fueron 23,9 y 93,7 UFR respectivamente a 635 nm y 532 nm. En comparación, el portaobjetos de vidrio poroso que se funcionalizó usando el procedimiento de la presente invención resumido en el Ejemplo 1 (es decir, tratado tanto con sol-gel como con aminosilano) indicó densidad de grupos amino funcionales de 1.311,7 nanomoles/ $\text{cm}^2$  (o 13.590 nanomoles/ $\text{cm}^3$ ). La auto-fluorescencia de este portaobjetos se midió como 36,3 y 332 UFR respectivamente a 635 nm y 532 nm. No se realizó el ensayo de ninhidrina sobre el sustrato no tratado ya que no se esperaba que hubiera grupos amino funcionales presentes. La auto-fluorescencia del portaobjetos no tratado vidrio poroso se midió en 23,1 y 39,4 UFR respectivamente a 635 nm y 532 nm.

Ejemplos de sustrato de microserie compuesto

Ejemplos comparativos

35 Se obtuvieron portaobjetos de microserie disponibles en el mercado y se analizaron para la densidad de grupos amino funcionales usando el ensayo de ninhidrina y para los niveles de auto-fluorescencia. Los portaobjetos de Corning, Telechem y Erie Scientific son todos portaobjetos de vidrio no poroso con superficies amino funcionales. En comparación, el portaobjetos de microserie Vivid® de Pall Corp. es una membrana polimérica de nylon microporoso unida de forma adhesiva a un portaobjetos de vidrio. Los resultados para estos portaobjetos de microserie comerciales se resumen en la Tabla 1.

TABLA 1

Nombre	Fuente	Densidad de grupos amino, nanomoles/ $\text{cm}^2$	635 nm - UFR prom.	532 nm - UFR prom.
Portaobjetos Ultragaps	Corning Life Sciences	4,8	21	23,4
Portaobjetos Array-It Superamine 2	Telechem International	0,9	21	26,5
Portaobjetos Aminofuncional	Erie Scientific Company	1,0	--	--
Portaobjetos de microserie Vivid	Pall Corporation	6,5	33,5	176

**Ejemplo 9**

Se unió una membrana de ePTFE a un portaobjetos de vidrio, después se funcionalizó.

Se trataron portaobjetos pre-limpiados de microscopio de vidrio lisos (VWR, nº catálogo 48300) con la solución de silano descrita anteriormente sumergiendo los portaobjetos en la solución durante 5 minutos, después aclarándolos en IPA durante 2 minutos y después calentándolos a 110°C durante 10 minutos. Los portaobjetos tratados con silano después se unieron a una membrana de ePTFE que era de 74 µm de grosor que tenía un punto de burbujeo de aproximadamente 0,434 MPa y que tenía una longitud promedio de fibrilla de 1,2 µm. La unión se realizó pulverizando una solución al 40% en peso de adhesivo epoxi TRABOND FDA2 (Tar-Con Inc., Bedford, MA) en metil etil ceteno sobre los portaobjetos de vidrio tratados con silano usando un kit de aerografía (McMaster-Carr, nº catálogo 9546T13).

Los portaobjetos tratados con adhesivo se colocaron en la parte superior de la membrana de ePTFE que estaba fijada en un bastidor de bordado. El adhesivo después se curó durante 60 minutos en un horno de aire forzado ajustado a 110°C. Después del curado, se recortó el exceso de membrana de ePTFE del portaobjetos de vidrio usando una cuchilla de afeitar. El portaobjetos compuesto resultante tenía una capa de membrana de ePTFE fijada a una de sus superficies. La superficie de la membrana era hidrófoba. Un ensayo de ninhidrina indicó que no había grupos amino funcionales presentes. Se esperaba que la auto-fluorescencia de la superficie de la membrana fuera de aproximadamente 21 y 22 UFR respectivamente a 635 nm y 532 nm.

Los portaobjetos compuestos después se colocaron en una rejilla de portaobjetos (Wheaton, nº catálogo 900403) y los portaobjetos se trataron con sol-gel sumergiéndolos en la solución de sol-gel diluida con partes iguales en peso de etanol. Después de 5 minutos de inmersión, los portaobjetos se retiraron y se aclararon en agua desionizada durante 5 minutos. Los portaobjetos aclarados se secaron al aire y después se calentaron a 150°C durante 5 minutos. En esta fase, la membrana de ePTFE era extremadamente hidrófila como se evidencia por el hecho de que se humedeció fácilmente con agua. Estos portaobjetos tratados con sol-gel se trataron adicionalmente sumergiéndolos en la solución de silano durante 5 minutos, después aclarando en IPA durante 2 minutos y después calentándolos en un horno ajustado a 110°C durante 10 minutos. En esta fase, la superficie de la membrana de ePTFE del portaobjetos poseía funcionalidad amino. Un ensayo de ninhidrina indicó la densidad de grupos amino funcionales en 338,6 nanomoles/cm<sup>2</sup>. El nivel de auto-fluorescencia de la superficie de la membrana del portaobjetos se midió en 22,7 y 191,2 UFR a 635 nm y 532 nm, respectivamente.

Comparando estos resultados con aquellos de la técnica previa presentados en la Tabla 1 se demuestra que la presente invención proporciona un portaobjetos de microserie con densidad de grupos amino funcionales significativamente mayor manteniendo al mismo tiempo el nivel de auto-fluorescencia comparable a productos comerciales basados en membrana polimérica porosa.

**Ejemplo 10**

Se limpiaron portaobjetos de microscopio pre-limpiados de vidrio liso (VWR, nº catálogo 48300) con acetona y después se unieron a una membrana de ePTFE que era de 74 µm de grosor que tenía un punto de burbujeo de aproximadamente 0,434 MPa y que tenía una longitud promedio de fibrilla of 1,2 µm. La unión se hizo pulverizando manualmente una solución al 40% en peso de adhesivo epoxi TRABOND FDA2 que contenía 1,8% (en sólidos epoxi) de 3-glicidoxipropoiltrimetoxisilano (G6720, United Chemical Technologies, Bristol, PA) en metil etil cetona sobre los portaobjetos de vidrio usando un kit de aerografía (McMaster-Carr, nº catálogo 9546T13) y después colocando los portaobjetos tratados con adhesivo sobre la parte superior de la membrana de ePTFE montada en un bastidor de bordado y curando el adhesivo en un horno de circulación de aire a 80°C durante 18 horas. Después del curado, se recortó el exceso de membrana de ePTFE manualmente del portaobjetos de vidrio usando una cuchilla de afeitar. El portaobjetos compuesto resultante tenía una capa de membrana de ePTFE fijada a una superficie. La superficie de la membrana era hidrófoba y el ensayo de ninhidrina indicó que no había grupos amino funcionales presentes. Se espera que la auto-fluorescencia de la superficie de la membrana sea de aproximadamente 21 y 22 UFR a 635 nm y 532 nm respectivamente.

Los portaobjetos compuestos después se colocaron en una rejilla de portaobjetos (Wheaton, nº catálogo 900403) y los portaobjetos se trataron con solución de sol-gel sumergiéndolos en la solución de sol-gel diluida con partes iguales en peso de etanol. Después de 5 minutos de inmersión, los portaobjetos se retiraron y se aclararon en agua desionizada durante 5 minutos. Los portaobjetos aclarados se secaron al aire y después se calentaron a 150°C durante 5 minutos. En esta fase, la membrana de ePTFE es extremadamente hidrófila y se humedece fácilmente con agua. Estos portaobjetos se trataron adicionalmente sumergiendo los portaobjetos tratados con sol-gel en la solución de silano durante 5 minutos, después aclarando en IPA durante 2 minutos y después calentándolos a 110°C durante 10 minutos. En esta fase, el nivel de auto-fluorescencia de la superficie de la membrana de ePTFE sobre el portaobjetos se midió en 27,4 y 350,8 UFR a 635 nm y 532 nm, respectivamente.

**Ejemplo 11**

El portaobjetos compuesto de microserie descrito en el Ejemplo 10 se procesó en UHN en diciembre de 2005 para determinar la proporción promedio de señal a ruido. Para comparación, también se procesaron portaobjetos de microserie Ultragaps (Corning) en ese momento. Se intentó una comparación similar usando portaobjetos de microserie Vivid (Pall Corp.) usando el mismo protocolo. Sin embargo, no fue posible imprimir la serie completa sobre estos portaobjetos usando el procedimiento de impresión por contacto aquí usado.

Es bien sabido que el nivel de ozono ambiental tiene un efecto significativo sobre la estabilidad de la señal en el canal Cy5. Las muestras de la técnica previa medidas en los meses de verano muestran valores muy inferiores de proporción de señal a ruido que muestras idénticas medidas en meses más fríos. Las muestras de la invención descritas previamente (Ejemplo 9) y las de la técnica previa de este ejemplo también se han ensayado en marzo de 2005. Los datos de señal a ruido aparecen en la Tabla 2.

TABLA 2

Descripción del portaobjetos	Número de portaobjetos usados	Proporción promedio de señal a ruido, Cy5	Proporción promedio de señal a ruido, Cy3
Muestra de la invención ensayada en diciembre	2	205,8	116,1
Muestra UltraGaps ensayada en diciembre	5	110,1	81,35
Muestra de la invención ensayada en marzo	2	191,5	93,7
Muestra UltraGaps ensayada en marzo	2	87,8	40,2

Estos datos demuestran los valores significativamente mayores de proporción de señal a ruido para los artículos de la invención en comparación con artículos de la técnica previa ensayados en el mismo tramo de tiempo. Los datos también indican la influencia de las estaciones sobre el rendimiento de los portaobjetos. Las señales Cy5 del sustrato de microserie de la invención muestran mucha menos influencia estacional que aquellos sustratos que representan la técnica previa. La muestra de la invención muestra una varianza de aproximadamente el 7%, mientras que la muestra convencional muestra una varianza de aproximadamente el 25%. La muestra de la invención por tanto tiene estabilidad potenciada (definida por menor del 20%, y preferentemente menor del 10%, variabilidad en las condiciones anteriores).

Las Figuras 3(A) y 3(B) muestran los diagramas de dispersión para muestras de la invención y de la técnica previa (Ultragaps) de este ejemplo, respectivamente, que se ensayaron en diciembre de 2005. También se muestra en estas figuras los límites de factor 2, factor 1,5 y factor 1,2 a partir de los cuales se calcularon diferentes niveles de precisión. Los valores del nivel de precisión se resumen en la Tabla 3.

TABLA 3

Descripción del portaobjetos	Número de portaobjetos ensayados	P <sub>2</sub> , nivel de precisión de factor 2, %	P <sub>1,5</sub> , nivel de precisión de factor 1,5, %	P <sub>1,2</sub> , nivel de precisión de factor 1,2, %
Muestra de la invención	2	100	99,99	99,92
Muestra de la técnica previa	5	99,88	98,88	92,73

Estos datos indican que los portaobjetos de microserie de la presente invención producen niveles de precisión significativamente mayores según se hacen más pequeños los límites de factor. Es decir, según se estrechan los límites de factor, se observa que el nivel de precisión del artículo de la invención mantiene su nivel de precisión extremadamente alto, mientras que se observa que la precisión del artículo de la técnica previa disminuye significativamente. Por consiguiente, los sustratos de la presente invención generan datos más útiles para un experimento de microserie dado en comparación con sustratos de la técnica previa. Además, el mayor nivel de precisión producido por el sustrato de la invención conduce a un mayor grado de confianza en los datos de la microserie, requiriendo de ese modo menos replicación de ensayos.

**Ejemplo 12**

Otro portaobjetos compuesto de microserie preparado según el procedimiento descrito en el Ejemplo 9 se procesó en UHN en marzo de 2005 para determinar la proporción promedio de señal a ruido. En este caso, se usó un conjunto clonal 7407 para el genoma de ratón como sonda. Para comparación, también se procesaron portaobjetos de microserie Ultragaps (Corning) simultáneamente. Se determinaron las proporciones de señal a ruido y los resultados se resumen en la Tabla 4.

TABLA 4

Descripción del portaobjetos	Número de portaobjetos usados	Proporción promedio de señal a ruido, Cy5	Proporción promedio de señal a ruido, Cy3
Muestra de la invención	2	75,8	54,5
Muestra UltraGaps	2	34,5	34,1

La microserie de la invención mostró una proporción señal a ruido mucho mayor para ambas longitudes de onda en comparación con microseries de la técnica previa.

- 5 También se crearon diagramas de dispersión de la intensidad de señal normalizada Cy5 y Cy3 para muestras de la invención y la técnica previa (Ultragaps) de este ejemplo. Los límites de factor 2, factor 1,5 y factor 1,2 se calcularon a partir de los diagramas de dispersión. Los valores del nivel de precisión se resumen en la Tabla 5.

TABLA 5

Descripción del portaobjetos	Número de portaobjetos ensayados	P <sub>2</sub> , nivel de precisión de factor 2, %	P <sub>1,5</sub> , nivel de precisión de factor 1,5, %	P <sub>1,2</sub> , nivel de precisión de factor 1,2, %
Muestra de la invención	2	99,98	99,91	97,87
Muestra UltraGaps	2	99,47	96,09	73,12

- 10 Estos datos indican que los portaobjetos de microserie de la presente invención producen niveles de precisión significativamente mayores según se hacen más pequeños los límites de factor. Es decir, según se estrechan los límites de factor, se observa que el nivel de precisión del artículo de la invención mantiene su nivel de precisión extremadamente alto, mientras que se observa que la precisión del artículo de la técnica previa disminuye significativamente. Por consiguiente, los sustratos de la presente invención generan datos más útiles para un experimento de microserie dado en comparación con sustratos de la técnica previa. Además, el mayor nivel de precisión producido por el sustrato de la invención conduce a un mayor grado de confianza en los datos de la microserie, requiriendo de ese modo menos replicación de ensayos.

### Ejemplo 13

- 20 El portaobjetos compuesto de microserie preparado según el procedimiento descrito en el Ejemplo 9 se procesó en UHN en junio de 2005 para determinar la proporción promedio de señal a ruido. En este caso, se usó un conjunto clonal 19008 del genoma humano como sonda. Para comparación, se procesaron portaobjetos de microserie Ultragaps (Corning) simultáneamente. Para estudiar la estabilidad de la señal, los mismos portaobjetos se exploraron en días secuenciales. Se determinaron las proporciones de señal a ruido y los resultados se resumen en la Tabla 6.

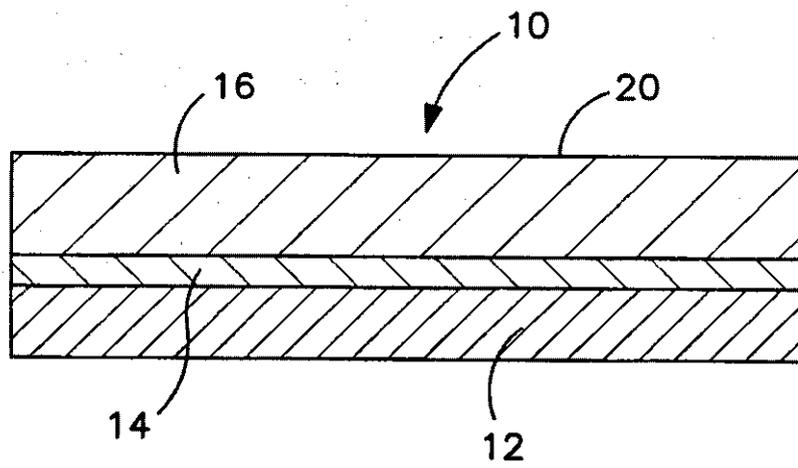
TABLA 6

	Muestra de la invención	Muestra de la invención	Muestra Ultragaps	Muestra Ultragaps
Tipo de colorante	Cy5	Cy3	Cy5	Cy3
Número de portaobjetos ensayados	3	3	3	3
Proporción S/N promedio en el día 1	88,9	54,8	11,5	25,6
Proporción S/N promedio en el día 2	58,3	38,1	1,5	20,6
Proporción S/N promedio en el día 3	53,3	30,7	1,05	20,9

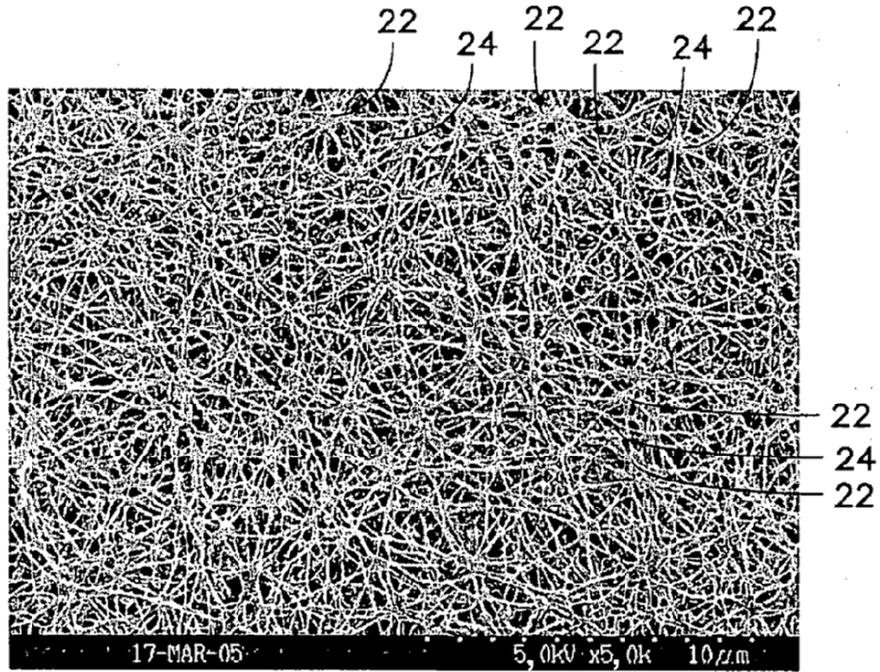
- 25 Los datos demuestran que el sustrato de microserie de la presente invención es significativamente más eficaz en retener la señal Cy5 sobre un periodo de tiempo más largo.

## REIVINDICACIONES

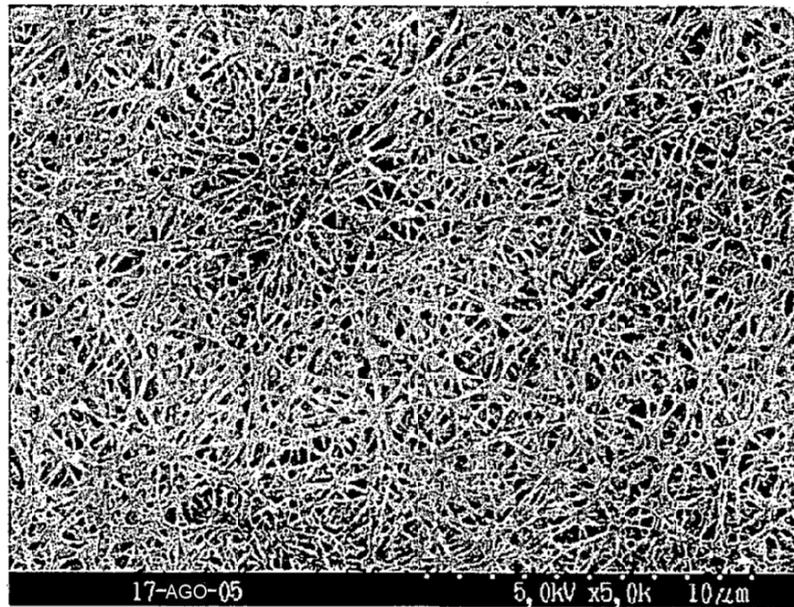
1. Un sustrato (12) que comprende una microestructura microporosa que comprende politetrafluoroetileno expandido, una capa intermedia que contiene una funcionalidad reactiva, estando depositada la capa intermedia sobre al menos una parte de dicha microestructura, y una capa funcional fijada a dicha capa intermedia,
  - 5 comprendiendo dicha capa intermedia un recubrimiento sol-gel o un alcohol polivinílico, teniendo dicha capa funcional sitios funcionales, creados por reacción de sustancias químicas funcionales con la funcionalidad de la capa intermedia, con una densidad de al menos 50 nanomoles/cm<sup>2</sup>.
2. Un sustrato definido en la reivindicación 1, en el que dichos sitios funcionales tienen una densidad seleccionada
  - 10 entre al menos 100 nanomoles/cm<sup>2</sup>, al menos 250 nanomoles/cm<sup>2</sup>, al menos 500 nanomoles/cm<sup>2</sup>, o al menos 1000 nanomoles/cm<sup>2</sup>.
3. Un sustrato (12) definido en la reivindicación 1, que comprende adicionalmente una densidad de sitios funcionalizados entre 2.500 y 150.000 nanomoles/cm<sup>3</sup>.
4. Un sustrato (12) de la reivindicación 1, en el que dichos sitios funcionales están seleccionados entre al menos uno de grupos hidroxilo, grupos amina, grupos carboxilo, grupos aldehído, y grupos epóxido.
5. Un sustrato (12) de la reivindicación 1, en el que dicha capa funcional comprende organosilano.
6. Un sustrato (12) de la reivindicación 1, en el que dicha capa intermedia comprende recubrimiento sol-gel, y dicha capa funcional comprende organosilano.
7. Un sustrato (12) de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente biomoléculas unidas a los sitios funcionales.
8. Un sustrato (12) de la reivindicación 7, en el que dichas biomoléculas están seleccionadas entre al menos uno de ácidos nucleicos, proteínas, péptidos, oligonucleótidos, anticuerpos, células, enzimas, y patógenos.
9. Un sustrato (12) de la reivindicación 1, usado como componente de al menos uno de una microserie, un filtro activo, una superficie de transferencia, o un dispositivo de diagnóstico.
10. Un procedimiento de creación de un artículo funcionalizado que comprende las etapas de:
  - 25 1. proporcionar un sustrato microporoso (12) que comprende politetrafluoroetileno expandido y que tiene una microestructura,
  2. depositar sobre al menos una parte de dicha microestructura una capa intermedia que comprende una funcionalidad reactiva, comprendiendo dicha capa intermedia un recubrimiento sol-gel o un alcohol polivinílico,
  3. y fijar una capa funcional a dicha capa intermedia y hacer reaccionar sustancias químicas funcionales con la
    - 30 funcionalidad de la capa intermedia para crear sitios funcionales de modo que dicho artículo tenga una densidad de sitios funcionales de al menos 50 nanomoles/cm<sup>2</sup>.
11. Un procedimiento definido en la reivindicación 10, que comprende adicionalmente una densidad de sitios funcionales entre 2.500 y 150.000 nanomoles/cm<sup>3</sup>.



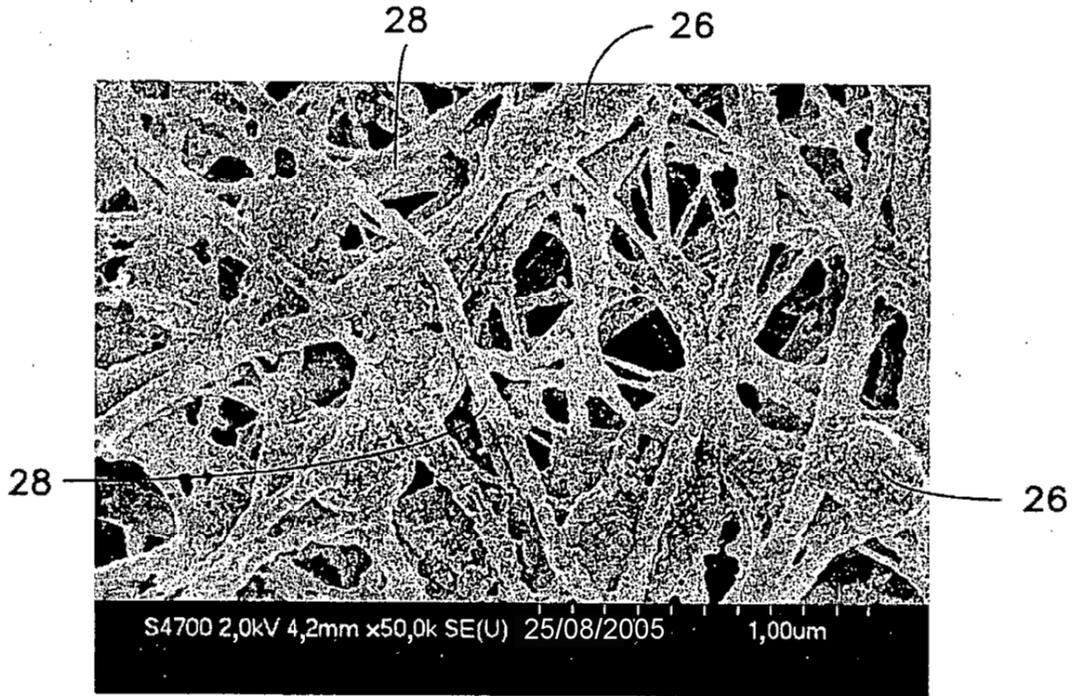
**FIG. 1**



**FIG. 2(A)**



**FIG. 2(B)**



**FIG. 2(C)**

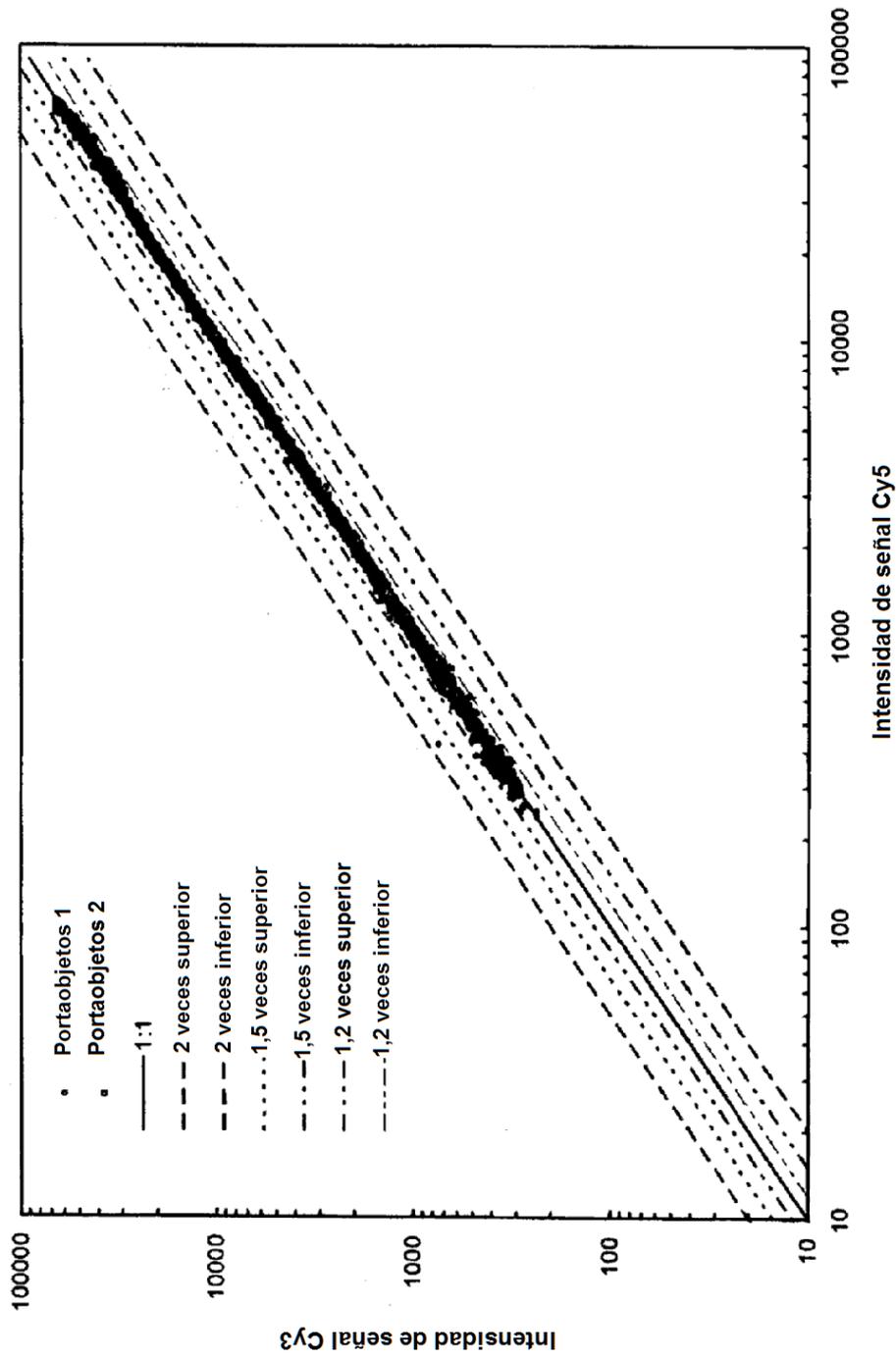


FIG. 3A

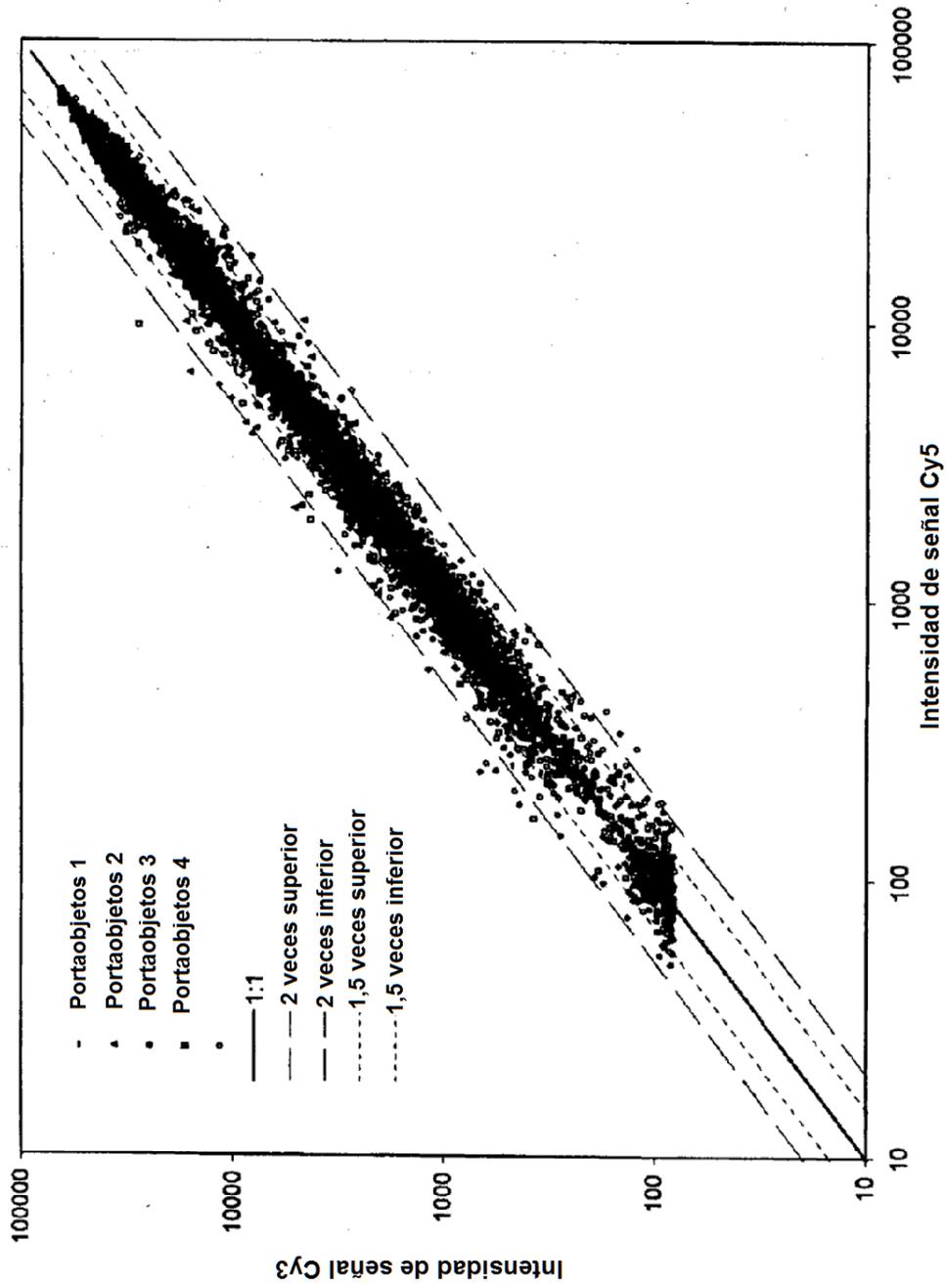


FIG. 3B