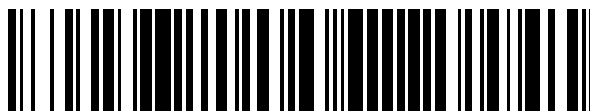


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 556 627**

51 Int. Cl.:

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.08.2007** **E 07837608 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.10.2015** **EP 2201374**

54 Título: **Métodos para determinar la concentración de un analito en solución**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.01.2016

73 Titular/es:

TRUSTEES OF TUFTS COLLEGE (100.0%)
BALLOU HALL 4TH FLOOR
MEDFORD, MA 02155, US

72 Inventor/es:

WALT, DAVID R. y
RISSIN, DAVID M.

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 556 627 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

Métodos para determinar la concentración de un analito en solución.

Antecedentes

Métodos que implantan una detección de analito de bajo nivel y alta densidad junto con protocolos experimentales rápidos y reproducibles son la piedra angular de las medidas analíticas modernas. Actualmente, las mayoría de las técnicas conocidas para cuantificar bajos niveles de analito en una matriz de muestra usan procedimientos de amplificación para incrementar el número de moléculas indicadoras y proporcionar de ese modo una señal medible. Estos procedimientos conocidos incluyen los ensayos de inmunoadsorción con enzimas ligadas (ELISA) para amplificar la señal en ensayos basados en anticuerpos, así como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar cadenas de ADN diana en ensayos basados en ADN. Una técnica de amplificación de dianas proteínicas más sensible pero indirecta, llamada inmuno-PCR (véase Sano, T.; Smith, C. L.; Cantor, C. R. *Science* 1992, 258, 120-122), hace uso de marcadores oligonucleotídicos, que posteriormente pueden amplificarse usando PCR y detectarse usando un ensayo de ADN (véase Nam, J. M.; Thaxton, C. S.; Mirkin, C. A. *Science* 2003, 301, 1884-1886; Niemeyer, C. M.; Adler, M.; Pignataro, B.; Lenhert, S.; Gao, S.; Chi, L. F.; Fuchs, H.; Blohm, D. *Nucleic Acids Research* 1999, 27, 4553-4561; y Zhou, H.; Fisher, R. J.; Papas, T. S. *Nucleic Acids Research* 1993, 21, 6038-6039). Aunque el método de inmuno-PCR permite la detección de proteínas a nivel ultrabajo, es un procedimiento de ensayo complejo, y puede tender a la generación de señales positivas falsas (véase Niemeyer, C. M.; Adler, M.; Wacker, R. *Trends in Biotechnology* 2005, 23, 208-216).

Una desventaja de los métodos conocidos para cuantificar exactamente la concentración de un analito particular en solución es que todos se basan en respuestas de conjunto en las que muchas moléculas de analito dan lugar a la señal medida. La mayoría de los esquemas de detección requieren que esté presente en el conjunto un gran número de moléculas para que la señal agregada esté por encima del umbral de detección. Esta desventaja limita la sensibilidad de la mayoría de las técnicas de detección y el intervalo dinámico (es decir, el intervalo de concentraciones que se pueden detectar).

Por lo tanto, existe una necesidad en la técnica de un método y un sistema mejorados para la detección de analitos. Específicamente, los métodos que detecten y midan moléculas individuales en lugar de un conjunto de moléculas mejorarán la sensibilidad, el intervalo dinámico y la exactitud de la detección de analito. La invención descrita aquí divide la muestra que se analiza en muestras pequeñas en las que solo están presentes estadísticamente una o ninguna molécula de analito. A continuación, estas moléculas de analito se detectan y se cuentan de modo digital para determinar la concentración de analito.

Rissin y Walt describen un método en el que se controlaron moléculas individuales de β -galactosidasa usando un haz de fibra óptica de 1 mm de diámetro con $2,4 \times 10^5$ reactores de micropocillo de femtolitros sellados individualmente. Mediante la observación de la acumulación de productos fluorescentes a partir de catalizadores de una sola molécula de enzima sobre la serie de recipientes de reacción y mediante la aplicación de un análisis estadístico de Poisson, se obtuvo una lectura digital de la concentración (Nano letters, 2006, 6(3), 520-523; J. Am. Chem. Soc., 2006, 128(1a), 6286-6287). Rissin y Walt elaboran adicionalmente su método en el documento WO 2007/098/48 A2.

Starzl y cols. describen un método y un sistema basados en la óptica para la detección de analitos que usan inmovilización en fase sólida, marcadores de analitos específicos para la generación de señales y procedimientos correspondientes para su utilización (WO 99/58948 A2).

Blicharz y cols. describen una serie de anticuerpos basados en microesferas múltiples capaz de medir simultáneamente 10 mediadores de proteínas inflamatorias (Anal. Chem., 2009, 81(6), 2106-2114).

Prabhakar y cols. describen el uso de la tecnología LabMap™ para cuantificar niveles de citocinas proinflamatorias tales como factor de necrosis tumoral α (TNF- α), interleucina-1 β (IL-1 β), IL-6 e IL-8 en muestras de plasma humano estimuladas por lipopolisacáridos (LPS) (J. of Immunol. Met, 2002, 260, 207-218).

Breve resumen de la invención

La invención se refiere a un método para determinar la concentración de un analito en una muestra de fluido que se va a probar, comprendiendo el método las etapas de:

(a) distribuir al menos una porción de las moléculas de analito en la muestra de fluido a través de una pluralidad de recipientes de reacción de modo que más de 20% pero menos de 95% de los recipientes de reacción contengan al menos una molécula, donde el analito está ligado a una nanopartícula o micropartícula mediante un componente de captura;

(b) determinar la presencia o ausencia del analito en cada recipiente de reacción para identificar el número de recipientes de reacción que contienen analito y/o para identificar el número de recipientes de reacción que no contienen analito; y

5 (c) determinar la concentración del analito en la muestra de fluido mediante un análisis de distribución gaussiana del número de recipientes de reacción que contienen el analito.

Breve descripción de los dibujos

10 Las FIG. 1a, 1b y 1c son vistas esquemáticas laterales transversales que representan un haz de fibras ópticas mordentado que forma una serie de micropocillos, según una realización de la presente invención. Las FIG. 1e, 1f y 1g son vistas esquemáticas laterales transversales que indican la localización de un componente de captura dentro de un micropocillo.

Las FIG. 2a, 2b y 2c son vistas esquemáticas laterales transversales que representan un ensayo de tipo sándwich, según una realización de la presente invención.

15 Las FIG. 3a y 3b son fotografías que reproducen estreptavidina Alexa Fluor 568® que se une a (a) una serie de micropocillos no pulida modificada con biotina en el extremo distal de un haz de fibras ópticas; y (b) una serie de micropocillos pulida modificada con biotina, según una realización de la presente invención.

Las FIG. 4a, 4b, 4c, 4d, 4e y 4f son fotografías que reproducen experimentos según una realización de la presente invención en la que β -galactosidasa hidroliza RDG para formar resorufina. Más específicamente, cada una de estas figuras indica una muestra diferente que tiene una concentración diferente de S β G. Las concentraciones eran: (a) 128 amol, (b) 51 amol, (c) 25 amol, (d) 7,5 amol y (e) 2,6 amol, y (f) era la referencia.

20 La FIG. 5 es un diagrama que reproduce una gráfica doblemente logarítmica de los moles de analito presentes en una muestra con el porcentaje resultante de recipientes de reacción activos, según una realización de la presente invención.

25 La FIG. 6a es una fotografía microscópica de un conjunto de micropocillos formados en el extremo distal de un haz de fibras ópticas y una vista ampliada de una inserción de la serie de micropocillos, según una realización de la presente invención.

La FIG. 6b es una imagen de AFM de una porción de una serie de micropocillos mordentada, según una realización de la presente invención.

30 Las FIG. 7a, 7b y 7c reproducen el cierre de los recipientes de reacción y la evaluación del componente de selladura, según una realización. La FIG. 7a es una fotografía microscópica de una solución de Ru(bpy)₃Cl₂ encerrada en la serie de recipientes de reacción. La FIG. 7b es una fotografía microscópica de una pequeña porción octogonal de los recipientes de reacción que se han fotoblanqueado con luz UV. La FIG. 7c es una fotografía microscópica de la FIG. 7b tomada 60 minutos más tarde.

35 Las FIG. 8a, 8b y 8c son fotografías microscópicas que reproducen la detección de la actividad de moléculas individuales de β -galactosidasa, según diversas realizaciones de la presente invención. La FIG. 8a es una fotografía microscópica de una imagen de fondo de una porción de una serie de recipientes de reacción. La FIG. 8b es una fotografía microscópica de una imagen tomada de una porción de una relación 1:5 de un ensayo de enzima a recipiente de reacción. La FIG. 8c es una fotografía microscópica de una relación 1:80 de un ensayo de enzima a recipiente de reacción.

La FIG. 9 es una representación esquemática de un formato de ensayo usado en el Ejemplo 3.

40 La FIG. 10 reproduce una gráfica de la concentración de proteína inducible 10 (IP-10) presente en una muestra de ensayo con el porcentaje resultante de recipientes de reacción activos. La gráfica indica que el ensayo se efectuó bajo condiciones que permitían la detección de lecturas binarias.

Descripción detallada

45 La invención proporciona un método para determinar la concentración de un analito en una muestra de fluido que se va a probar. El método comprende las etapas de: (a) distribuir al menos una porción de las moléculas de analito en la muestra de fluido a través de una pluralidad de recipientes de reacción de modo que más de 20% pero menos de 95% de los recipientes de reacción contengan al menos una molécula, donde el analito se liga a una nanopartícula o micropartícula mediante un componente de captura; (b) determinar la presencia o ausencia del analito en cada recipiente de reacción para identificar el número de recipientes de reacción que contienen analito y/o para identificar el número de recipientes de reacción que no contienen analito; y (c) determinar la concentración del analito en la

50

muestra de fluido mediante un análisis de distribución gaussiana del número de recipientes de reacción que contienen el analito.

Se entiende que el método precedente se puede realizar usando un número de diferentes formatos de ensayo, diferentes condiciones de reacción, marcadores detectables y sistemas de detección. En una realización, por ejemplo, la invención permite la detección y/o la cuantificación de analitos usando series de recipientes de reacción de tamaño de micro- a nanoescala. En un enfoque, los recipientes de reacción contienen componentes de captura que capturan el analito dentro del recipiente de reacción. En tal enfoque, una serie de recipientes de reacción que contienen un componente de captura inmovilizado se pone en contacto con una muestra que contiene al menos un analito. Después de la captura del analito, dependiendo de qué marcador se use, la presencia de analito se puede detectar directamente o indirectamente.

El enfoque directo puede incluir, por ejemplo, la situación en la que el analito es una enzima. En este caso, se incluye en la mezcla de reacción un sustrato enzimático cromogénico, fluorogénico o quimioluminiscente y la actividad enzimática del analito produce un producto detectable. El enfoque indirecto puede incluir, por ejemplo, la situación en la que el analito no tiene actividad enzimática intrínseca y se permite que un marcador se una, por ejemplo, a través de un ligando de unión secundario, al analito. Por ejemplo, un marcador detectable conjugado a un ligando de unión secundario (por ejemplo, un componente de captura diferente al usado para capturar el analito) se añade al analito capturado bajo condiciones que permiten que el ligando de unión secundario se una al analito inmovilizado. Posteriormente, se puede determinar la presencia del marcador para proporcionar una indicación de si el analito está presente en el recipiente de reacción. Se entiende que se puede usar en la práctica de la invención una variedad de diferentes marcadores. En tanto que se emplee un marcador enzimático, un sustrato enzimático se puede añadir al recipiente de reacción, con lo que la enzima convierte el sustrato en un producto detectable cromogénico, fluorogénico o quimioluminiscente para permitir la detección del analito. El número o porcentaje de recipientes de reacción con analitos capturados se puede usar para calcular la cantidad de analito en la muestra usando un método de lectura binario.

De forma similar, se entiende que en ciertos formatos de ensayo, algunos o la totalidad de los recipientes de reacción pueden estar definidos sobre un soporte plano en vez de dentro de los rebajes de una serie de micropocillos. Por ejemplo, la muestra que contiene analito se divide en una pluralidad de segundas muestras de fluido más pequeñas de igual volumen. Las segundas muestras de fluido se aplican a continuación como gotículas a la superficie de una superficie plana de unión para crear una serie de gotículas. Cada gotícula se puede aplicar a una región de la superficie plana de unión que tiene un componente de captura inmovilizado sobre la misma. A continuación, las muestras se incuban para permitir que el analito se una al componente de captura inmovilizado sobre la superficie plana de unión. Posteriormente, dependiendo del marcador que se emplee, la presencia del analito se puede determinar directamente o indirectamente a fin de permitir la identificación del número de muestras de fluido que contienen el analito y el número de muestras de fluido que no contienen el analito. En ciertas realizaciones, por ejemplo, cuando el marcador es un marcador enzimático, se puede añadir un sustrato enzimático a la superficie de la superficie plana de unión y las diversas regiones que contienen el componente de captura (en presencia o ausencia de analito). A continuación, el sustrato plano de unión se sella contra una serie de micropocillos para formar una serie de recipientes de reacción para permitir el desarrollo de un producto detectable en cada recipiente de reacción. A partir del número de recipientes de reacción que contienen el analito en la serie de recipientes de reacción, es posible determinar la concentración de analito en la solución de prueba.

En una realización, la presente invención usa una serie de recipientes de reacción de tamaño de micro- a nanoescala específicamente funcionalizados con componentes de captura y capaces de capturar moléculas de analito. La capacidad para capturar el analito permite el uso de etapas de lavado y ensayos indirectos, según se esboza posteriormente. En una realización, el marcador usado para detectar el analito capturado es una enzima. Una vez capturada en recipientes de reacción individuales, la enzima cataliza la producción de un número suficiente de moléculas de producto cromogénico, fluorogénico o quimioluminiscente para generar una señal detectable. Según una realización que se refiere a muestras que tienen bajas concentraciones de analito, solo una porción de los recipientes de reacción captura una molécula de analito, permitiendo de ese modo una lectura binaria de la concentración de analito a partir de la serie de recipientes de reacción. La amplificación enzimática directa en el método y el sistema de la presente invención permite la amplificación directa de una señal detectable.

La presente invención permite la detección de bajas concentraciones de analitos, tales como proteínas. A bajas concentraciones, un número estadísticamente significativo de recipientes de reacción contiene cero, una o varias moléculas del analito diana. Al observar la presencia o ausencia de un marcador detectable presente en cada recipiente de reacción, se puede usar un método de lectura binaria para identificar el número de recipientes de reacción que contienen una o más moléculas del analito. Como resultado, el porcentaje de recipientes de reacción ocupados por analito se puede usar para calcular la concentración aparente original del analito en la muestra de interés. Las siguientes secciones analizan series ejemplares de recipientes de reacción, componentes de captura, analitos que se pueden detectar mediante la invención, marcadores detectables y protocolos de detección de señales, métodos de ensayo y usos ejemplares de la invención.

I. Series de recipientes de reacción

La presente invención utiliza una serie de recipientes de reacción para llevar a cabo etapas en un ensayo utilizado para determinar la concentración de un analito de interés. El propósito de la serie de recipientes de reacción es permitir que un volumen de reacción se distribuya en una pluralidad de volúmenes de reacción discretos durante una o más etapas de un ensayo. Por "serie" se entiende en la presente memoria una pluralidad de recipientes de

5 reacción similares.

Los recipientes de reacción pueden tener todos el mismo volumen o pueden ser de volúmenes diferentes, pero conocidos. El volumen de cada recipiente de reacción individual puede variar de attolitros a nanolitros dependiendo del analito de interés y la concentración esperada de ese analito en una solución. En una realización, el tamaño del

10 recipiente de reacción se puede seleccionar de modo que se esperaría que a la concentración de interés se encontraran entre cero y diez moléculas del analito de interés en cada recipiente de reacción. Según una realización de la presente invención, los recipientes de reacción tienen un volumen que varía de aproximadamente 10 attolitros a aproximadamente 50 picolitros. Alternativamente, los recipientes de reacción varían en tamaño de aproximadamente 1 picolitro a aproximadamente 50 picolitros. En una alternativa adicional, los recipientes de

15 reacción varían en tamaño de aproximadamente 1 femtolitro a aproximadamente 1 picolitro. En una alternativa adicional, los recipientes de reacción varían de aproximadamente 30 femtolitros a aproximadamente 60 femtolitros.

El número de recipientes de reacción en la serie dependerá de la composición y el uso final de la serie. Se pueden elaborar series que contienen de aproximadamente 2 a muchos miles de millones de recipientes de reacción al utilizar una variedad de técnicas y materiales. Se puede usar un incremento del número de recipientes de reacción en la serie para incrementar el intervalo dinámico de una serie o para permitir que se ensayen en paralelo múltiples

20 muestras o múltiples analitos. Generalmente, la serie comprenderá entre mil y un millón de recipientes de reacción por muestra que se va a analizar. Las series usadas para analizar simultáneamente múltiples muestras contendrán generalmente entre 10 mil y 10 mil millones de recipientes de reacción.

La serie de recipientes de reacción se puede disponer sobre una estructura plana o en alguna disposición tridimensional. Pueden estar en un diseño regular o distribuidos aleatoriamente. Una realización preferida utiliza un

25 patrón regular de centros en una estructura plana de modo que los centros se puedan dirigir en el plano de coordenadas X-Y.

Los recipientes de reacción se pueden formar en un material sólido. Como será apreciado por los expertos en la especialidad, el número de posibles materiales es muy grande e incluye, pero no se limita a, vidrio y vidrio modificado o funcionalizado, plásticos (incluyendo materiales acrílicos, poliestireno y copolímeros de estireno y otros

30 materiales, polipropileno, polietileno, polibutileno, poliuretanos, Teflon™, etc.), polisacáridos, nailon o nitrocelulosa, materiales compuestos, materiales cerámicos y resinas plásticas, sílice o materiales basados en sílice incluyendo silicio y silicio modificado, carbono, metales, vidrios inorgánicos, plásticos, haces de fibras ópticas, y una variedad de otros polímeros. En general, los sustratos permiten la detección óptica y no emiten fluorescencia apreciablemente.

Los recipientes de reacción también se pueden formar en un líquido con tal de que el líquido de confinamiento no se mezcle con el líquido que define el recipiente de reacción y que el recipiente de reacción sea estable. Ejemplos de

35 líquidos adecuados para confinar reacciones acuosas incluyen, pero no se limitan a, emulsiones de agua en aceite, agregados lipídicos extruidos, suspensiones estables de lípidos, agregados de cristal líquido, micelas en agua, micelas invertidas en aceite, y suspensiones de células, bacterias y virus.

Los recipientes de reacción individuales pueden contener una superficie de unión. La superficie de unión puede ser la totalidad o una porción de la superficie interior del recipiente de reacción o puede estar sobre la superficie de algo que esté confinado dentro del recipiente de reacción tal como una cuenta o una partícula (por ejemplo, una micropartícula o una nanopartícula).

40

En una realización, la serie de recipientes de reacción se forma al acoplar una serie de micropocillos con un componente de selladura. Los micropocillos son pequeñas depresiones en una primera superficie de un material de

45 soporte. Los micropocillos se pueden formar como se conoce generalmente en la especialidad usando una variedad de técnicas, incluyendo, pero no limitadas a, fotolitografía, técnicas de estampación, técnicas de moldeo y técnicas de micromordentado. Como será apreciado por los expertos en la especialidad, la técnica usada dependerá de la composición y la conformación del material de soporte. El componente de selladura tiene una segunda superficie con la misma topología que la primera superficie que, cuando se pone en contacto con la primera superficie, crea una serie de recipientes de reacción sellados. Bien la primera superficie o bien la segunda superficie pueden estar fabricadas de un material elástico para ayudar a la selladura. Cualquiera o ambas superficies pueden ser hidrófobas o contener regiones hidrófobas para minimizar la fuga desde los microrreactores.

50

En otra realización, la serie de recipientes de reacción se forma utilizando un dispositivo microfluídico que contiene canales y válvulas que se pueden cerrar para aislar volúmenes de reacción discretos.

En una realización preferida, se forma una serie de recipientes de reacción creando micropocillos sobre el extremo distal de un haz de fibras ópticas y utilizando una superficie plana flexible como un componente de selladura. Tal serie de recipientes de reacción se puede elaborar como sigue. En primer lugar, una serie de micropocillos se mordenta en el extremo distal de un haz de fibras ópticas pulido. El diámetro de las fibras ópticas y la profundidad del

55

mordentado se pueden variar para crear micropocillos del volumen deseado. El procedimiento de mordentado crea los micropocillos en el material central de las fibras de vidrio individuales en el haz, de modo que cada pocillo esté alineado con una fibra individual y aislado de pocillos adyacentes por el material de revestimiento que se mordenta más lentamente. Una ventaja del formato en serie de fibras ópticas es que puede producir de miles a millones de recipientes de reacción sin la necesidad de complicados procedimientos de microfabricación y proporciona la capacidad de observar muchos recipientes de reacción simultáneamente.

Cada micropocillo está alineado con una fibra óptica del haz de modo que el haz de fibras ópticas pueda transportar luz tanto de excitación como de emisión hasta y desde los pocillos, permitiendo la interrogación remota del contenido de los pocillos. Además, una serie de fibras ópticas proporciona la capacidad de excitación simultánea de moléculas en recipientes adyacentes, sin "interferencia" de señales entre fibras. Esto es, la luz de excitación transmitida en una fibra no escapa a una fibra vecina. En un aspecto de la presente invención, las alteraciones físicas se pueden realizar como se muestra en las Patentes de EE. UU. 6.023.540, 6.327.410 y 6.858.394. Bien la superficie de los micropocillos de vidrio, bien la superficie del componente de selladura o bien las partículas se pueden funcionalizar para crear una superficie de unión.

Alternativamente, las estructuras equivalentes se pueden fabricar usando otros métodos que no comprenden los extremos de un haz de fibras ópticas. Por ejemplo, la serie puede ser un sustrato punteado, impreso o fotolitográfico conocido en la especialidad; véanse, por ejemplo, los documentos WO 95/25116, WO 95/35505, PCTUS98/09163, las Patentes de EE. UU. Nº 5.700.637, 5.807.522 y 5.445.934; y los documentos U.S.S.N. 08/851.203 y 09/187.289.

II. Componentes de captura

Durante la práctica de la invención, las superficies de unión dentro de los recipientes de reacción (incluyendo los micropocillos definidos en haces de fibras ópticas) incorporan al menos un componente de captura. Un componente de captura (también denominado comúnmente un "ligando de unión de captura", "ligando de unión", "especie de unión de captura" o "sonda de captura") es cualquier molécula, compuesto o modificación del soporte sólido que se pueda usar para sondear, ligarse a, unirse a o capturar de otro modo un analito dispuesto sobre un soporte sólido, de modo que el analito se inmovilice durante el ensayo. Generalmente, el componente de captura permite la ligazón de un analito a un soporte sólido (esto es, la superficie de los micropocillos, el componente de selladura o la nanopartícula) con propósitos de detección, cuantificación u otros análisis.

Como será apreciado por los expertos en la especialidad, la composición del componente de captura dependerá de la composición del analito. Se conocen componentes de captura para una amplia variedad de analitos o se pueden encontrar fácilmente usando técnicas conocidas. Por ejemplo, cuando el analito es una proteína, los componentes de captura incluyen proteínas (incluyendo particularmente anticuerpos o fragmentos de los mismos (FABs, etc.)) o moléculas pequeñas. Proteínas de componentes de captura preferidas incluyen péptidos. Por ejemplo, cuando el analito es una enzima, componentes de captura adecuados incluyen sustratos e inhibidores. Pares antígeno-anticuerpo, ligandos de receptores, y carbohidratos y sus parejas de unión también son parejas de analito-componente de captura adecuadas. Además, cuando el analito es un ácido nucleico monocatenario, el componente de captura puede ser un ácido nucleico complementario. De forma similar, el analito puede ser una proteína que se une a ácido nucleico y el componente de captura es un ácido nucleico bien monocatenario o bien bicatenario; alternativamente, el componente de captura puede ser una proteína que se une a ácido nucleico cuando el analito es un ácido nucleico mono- o bicatenario. Alternativamente, como se describe generalmente en las Patentes de EE. UU. 5.270.163, 5.475.096, 5.567.588, 5.595.877, 5.637.459, 5.683.867, 5.705.337 y patentes afines, se pueden desarrollar "adaptámeros" de ácido nucleico para capturar virtualmente cualquier analito. Como será apreciado por los expertos en la especialidad, se pueden usar dos moléculas cualesquiera que se asocien, bien como un analito o bien como el componente de captura. De forma similar, cuando el analito es un carbohidrato, componentes de captura adecuados incluyen anticuerpos y lectinas. Se entiende que existe una gran cantidad de bibliografía relativa al desarrollo de componentes de captura basándose en métodos químicos combinatorios.

Pares analito/componente de captura adecuados incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos/antígenos, receptores/ligandos, proteínas/ácido nucleico, enzimas/sustratos y/o inhibidores, carbohidratos (incluyendo glicoproteínas y glicolípidos)/lectinas, proteínas/proteínas, proteínas/moléculas pequeñas; y los carbohidratos y sus parejas de unión también son pares analito-componente de captura adecuados. Estos pueden ser secuencias naturales o derivadas. Según una realización, los componentes de captura son porciones (particularmente las porciones extracelulares) de receptores de la superficie celular que se sabe que se multimerizan, tales como el receptor de la hormona del crecimiento, transportadores de glucosa (particularmente receptor de GLUT 4) y receptores de células T.

En una realización preferida, el componente de captura se liga a una superficie de unión (por ejemplo, la superficie de un micropocillo) a través de un "componente de ligazón" (también denominado en la presente memoria un "conector de ligazón"). Un "componente de ligazón", según se usa en la presente memoria, se define como cualquier componente, funcionalización o modificación de la superficie de unión que dé como resultado la ligazón del componente de captura, y puede incluir enlaces y/o conectores. Alternativamente, el componente de captura puede utilizar un componente extendedor de captura. En esta realización, el componente de captura comprende una

primera porción que se unirá al analito y una segunda porción que se puede usar para la ligazón a la superficie de unión.

Este componente de ligazón también puede proporcionar una capa protectora que resguarda la superficie de unión, tal como el vidrio de un haz de fibras ópticas, de la solución de ensayo. Como resultado, el componente de ligazón minimiza la ligazón no específica de moléculas no elegidas como diana a la superficie de unión durante el ensayo y la detección que podría conducir a pocillos fluorescentes no deseados y señales positivas falsas.

El método de ligazón del componente de captura al componente de ligazón se realizará generalmente como se sabe en la especialidad, y dependerá de la composición del componente de ligazón y el componente de captura. En general, los componentes de captura se ligan al componente de ligazón a través del uso de grupos funcionales de cada uno que se pueden usar a continuación para la ligazón. Según una realización, el grupo funcional es una funcionalidad química. Esto es, la superficie de unión se deriva de modo que se presente una funcionalidad química en la superficie de unión. Grupos funcionales preferidos para la ligazón son grupos amino, grupos carboxi, grupos epóxido, grupos maleimida, grupos oxo y grupos tiol. Estos grupos funcionales se pueden ligar, bien directamente o bien a través del uso de un conector, cuya combinación se denomina a veces en la presente memoria "reticulador". Los conectores se conocen en la especialidad; por ejemplo, conectores homo- o heterobifuncionales que son muy conocidos (véase 1994 Pierce Chemical. Catálogo de la compañía, sección técnica sobre reticuladores, páginas 155-200). Reticuladores preferidos incluyen, pero no se limitan a, grupos alquilo (incluyendo grupos alquilo sustituido y grupos alquilo que contienen restos heteroátomo), prefiriéndose los grupos alquilo cortos, los ésteres, los grupos amida, amina, epoxi y el etilenglicol y derivados. Los conectores también pueden ser un grupo sulfona, formando una sulfonamida.

Según una realización, el grupo funcional es un grupo funcional activado por luz. Esto es, el grupo funcional se puede activar por luz para ligarse al componente de captura o al componente de ligazón. Un ejemplo es la tecnología PhotoLink™ disponible de SurModics, Inc. de Eden Prairie, MN.

Alternativamente, el componente de ligazón se añade sin modificar covalentemente la superficie de unión. Esto es, el componente de ligazón se puede añadir a la superficie de unión al usar una molécula que tiene tanto un grupo funcional como un grupo que tiene afinidad de unión para la superficie de unión. Alternativamente, el componente de ligazón es cualquier proteína capaz de unirse o pegarse a la superficie de unión. En una alternativa adicional, el componente de ligazón es cualquier molécula capaz de unirse o pegarse a la superficie del recipiente. En un ejemplo, el componente de ligazón es albúmina de suero con grupos amina libres sobre su superficie. A continuación, se puede añadir un reticulador para ligar los grupos amina de la albúmina al componente de captura.

Según una realización en la que el componente de captura es un reticulador químico, el analito se captura sobre la superficie de unión usando reticulación química del siguiente modo. En primer lugar, la superficie de unión se deriva con un grupo funcional, tal como un grupo amino. Posteriormente, un reticulador y el analito se ponen en contacto con la superficie de unión de modo que un extremo del reticulador se ligue al grupo amina y el analito se ligue al otro extremo del reticulador. En una realización alternativa descrita con más detalle posteriormente en la que el analito no es una enzima, un marcador que tiene un componente enzimático también se puede ligar al analito.

De este modo, se pueden añadir componentes de captura que comprenden proteínas, lectinas, ácidos nucleicos, moléculas orgánicas pequeñas y carbohidratos.

Una realización utiliza componentes de captura proteínicos. Como se sabe en la especialidad, se puede usar cualquier número de técnicas para ligar un componente de captura proteínico. "Proteína" en este contexto incluye proteínas, polipéptidos, péptidos, incluyendo, por ejemplo, enzimas y anticuerpos. Se conoce una amplia variedad de técnicas para añadir restos a proteínas. Un método preferido se esboza en la Patente de EE. UU. Nº 5.620.850. Se conoce la ligazón de proteínas a superficies; véase además Heller, Acc. Chem. Res. 23:128 (1990) y el trabajo relacionado.

Una realización alternativa utiliza ácidos nucleicos como el componente de captura, por ejemplo cuando el analito es un ácido nucleico o una proteína que se une a ácido nucleico, o cuando el ácido nucleico sirve como un adaptámero para unirse a una proteína, como es bien conocido en la especialidad.

Según una realización, cada superficie de unión presenta una pluralidad de moléculas de componente de captura. La pluralidad de moléculas de componente de captura, en un aspecto de la invención, se distribuye sobre la superficie de unión como un "césped". Alternativamente, los componentes de captura se distribuyen de cualquier forma conocida.

La unión entre el componente de captura y el analito, según una realización, es específica y el componente de captura es parte de un par de unión. Esto es, el componente de captura es un componente de captura específico para una diana que se une específicamente o tiene especificidad para el analito. Más específicamente, el componente de captura se une específicamente y directamente al analito. Por "unirse específicamente" o "especificidad de unión" se entiende en la presente memoria que el componente de captura se une al analito con una especificidad suficiente para diferenciar entre el analito y otros componentes o contaminantes de la muestra de prueba. Por ejemplo, el componente de captura según una realización es un anticuerpo que se une específicamente

a alguna porción del analito. El anticuerpo, según una realización, puede ser cualquier anticuerpo capaz de unirse específicamente a un analito. Por ejemplo, anticuerpos apropiados incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos monoclonales, anticuerpos biespecíficos, minicuerpos, anticuerpos de dominio, anticuerpos sintéticos (a veces denominados "miméticos de anticuerpo"), anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, fusiones de anticuerpos (a veces denominadas "conjugados de anticuerpos"), y fragmentos de cada uno, respectivamente.

Sin embargo, como será apreciado por los expertos en la especialidad, es posible detectar analitos usando una unión que no sea muy específica. Por ejemplo, los sistemas pueden usar diferentes componentes de captura tales como, por ejemplo, un conjunto de diferentes ligandos de unión, y la detección de cualquier analito particular es a través de su "firma" de unión a este conjunto de ligandos de unión, de modo similar a la manera en la que funcionan las "narices electrónicas". Esto encuentra una utilidad particular en la detección de analitos químicos. La afinidad de unión entre un analito y un componente de captura debe ser suficiente para que permanezcan unidos bajo las condiciones del ensayo, incluyendo las etapas de lavado para retirar la unión no específica. En algunas realizaciones, por ejemplo en la detección de ciertas biomoléculas, las constantes de unión del analito al componente de captura serán al menos aproximadamente 10^4 - 10^6 M⁻¹, prefiriéndose al menos aproximadamente de 10^5 a 10^9 M⁻¹ y prefiriéndose particularmente al menos aproximadamente 10^7 - 10^9 M⁻¹.

Según una realización en la que el analito es una célula, incluyendo, por ejemplo, células bacterianas, el componente de captura puede ser una molécula receptora de adhesina. Durante el uso, la molécula receptora de adhesina se une a una proteína de superficie llamada una adhesina sobre la superficie extracelular de la célula diana, inmovilizando o capturando de ese modo la célula. Alternativamente, en realizaciones en las que el analito es otro tipo de célula (una célula no bacteriana), el componente de captura es un receptor de la superficie celular apropiado que se une a la célula analito. En una realización adicional en la que el analito es una célula, el componente de captura es fibronectina. Por ejemplo, se puede usar fibronectina cuando el analito es una célula nerviosa.

Alternativamente, el componente de captura es un componente de captura no específico. Esto es, el componente de captura no se une específicamente al analito, sino que en cambio se une a un socio de unión correspondiente asociado con o ligado al analito. Por ejemplo, el componente de captura no específico según una realización es un reticulador químico como el descrito anteriormente. Según una realización, todas las moléculas de péptido en una muestra de analito se pueden ligar al reticulador químico. En un ejemplo de un componente de captura no específico según una realización, el componente de captura es estreptavidina, que se une con gran afinidad a biotina, y así captura cualquier molécula a la que se haya ligado la biotina. Alternativamente, el componente de captura es biotina, y la estreptavidina se liga a o se asocia con el analito de modo que el analito pueda ser capturado por la biotina.

Según una realización, el componente de captura se añade a la superficie de unión del siguiente modo. En primer lugar, se prepara una serie de micropocillos sobre el extremo distal de un haz de fibras ópticas para la ligazón del componente o los componentes de captura. Esto es, la superficie de unión de los micropocillos se modifica o se añade un componente de ligazón a la superficie de unión de los micropocillos de modo que el componente o los componentes de captura se ligue o se ligan a la superficie de unión de los micropocillos. En una realización, la superficie de unión de los micropocillos se deriva con una funcionalidad química como la descrita anteriormente. Posteriormente, se añade el componente de captura.

Un ejemplo de ligazón a componente de captura se reproduce en la FIG. 1, en la que la superficie de unión de una serie de micropocillos de la presente invención se funcionaliza con biotina. Como se muestra en la FIG. 1a, la serie de micropocillos de la presente invención en este ejemplo se forma en el extremo distal de un haz 26 de fibras ópticas. Para ligarse al componente de captura, la superficie de unión de los micropocillos se modifica en primer lugar con un componente 28 de ligazón, que en este ejemplo es un aminopropilsilano 28 que está unido a las superficies tanto central 30 como de revestimiento 32 del extremo distal del haz 26 de fibras, como se muestra en la FIG. 1b. La modificación con aminopropilsilano es eficaz en este ejemplo debido a que se liga NHS-biotina a una superficie 28 de unión aminosilanizada. Sin embargo, puesto que el componente de captura debe estar presente solamente dentro de los micropocillos, las superficies externas del haz de fibras ópticas, tales como las superficies externas del revestimiento 32, no deben estar silanizadas. Esto es, la silanización se debe retirar de la superficie 32 de revestimiento externa para evitar la ligazón de biotina. En este ejemplo que se muestra en la FIG. 1c, la silanización 28 se retiró de la capa 32 de revestimiento externa al pulir el haz de fibras ópticas aminosilanizado durante 10 segundos con un película de recubrimiento de 0,3 µm, retirando de ese modo la capa de revestimiento aminosilanizada superior.

Después de que el componente 28 de ligazón se haya añadido a la superficie de unión de los micropocillos, se puede ligar el componente de captura. El componente de captura puede ser biotina. Por ejemplo, con respecto a la FIG. 1d, éster succinimidílico de biotina se liga a los grupos 28 amino sobre las superficies de unión de los micropocillos 10.

Ejemplos de componentes de captura dentro del micropocillo 10 se representan en las FIG. 1e-g. Un componente 16 de captura se puede localizar sobre la superficie del micropocillo 10, que puede contener un sello 38 opcional (FIG. 1e), sobre una micropartícula 34 contenida dentro del micropocillo 10, que puede contener un sello 38 opcional (FIG. 1f), y/o sobre el sello 36 del micropocillo 10 (FIG. 1g).

Otro ejemplo de una ligazón de componente de captura se reproduce en la FIG. 9, en la que la superficie de unión de los micropocillos de la presente invención se funcionaliza con un anticuerpo para el analito de interés. Como se muestra en la FIG. 9, que se analiza con más detalle en el Ejemplo 3, se forma una serie de micropocillos en el extremo distal de un haz 10 de fibras ópticas. Para ligarse al componente 16 de captura de anticuerpo, la superficie de unión de los micropocillos se modifica en primer lugar con un componente de ligazón, que en el Ejemplo 3 es aminopropilsilano que se ha hecho reaccionar con el reticulador homobifuncional carbonato de N,N'-disuccinimidilo. Esta superficie reacciona a continuación con grupos lisina sobre el anticuerpo para presentar el componente de captura en la superficie de unión de los micropocillos.

III. Analitos

Como se analiza en la presente memoria, la serie de recipientes de reacción en la presente invención proporciona detección, cuantificación y un análisis adicional de analitos. Por "analito" o equivalentes gramaticales se entiende en la presente memoria cualquier átomo, molécula, ion, ion molecular, compuesto, partícula, célula o virus que se vaya bien a detectar o bien a evaluar.

Según una realización, el analito es una enzima. Por ejemplo, la enzima puede ser una enzima de cualquiera de las siguientes clasificaciones de enzimas: oxidorreductasas, transferasas, cinasas, hidrolasas, liasas, isomerasas y ligasas. Así, enzimas apropiadas incluyen, pero no se limitan a, polimerasas, cathepsinas, calpaínas, aminotransferasas tales como, por ejemplo, AST y ALT, proteasas tales como, por ejemplo, caspasas, nucleótido ciclasas, transferasas, lipasas, enzimas asociadas con ataques cardíacos, y similares. Cuando el sistema de la presente invención se usa para detectar dianas virales o bacterianas, enzimas apropiadas incluyen polimerasas virales o bacterianas y otras enzimas tales, incluyendo proteasas virales o bacterianas.

Alternativamente, el analito tiene un componente enzimático. Por ejemplo, el analito puede ser una célula que tiene una enzima o un componente enzimático presente sobre su superficie extracelular. Alternativamente, el analito es una célula que no tiene componente enzimático sobre su superficie. Tal célula se identifica típicamente usando un método de ensayo indirecto descrito posteriormente como un ensayo de tipo "sándwich".

Según otra realización, el analito no es una enzima. Como se entenderá por los expertos en la especialidad, un gran número de analitos se puede usar en la presente invención; básicamente, se puede usar cualquier analito que se una a un componente de captura y/o un ligando de unión secundario. Como se explicará con más detalle más adelante, estos analitos se identifican típicamente usando un ensayo indirecto tal como un ensayo de tipo "sándwich". Como se mencionó anteriormente, un analito adecuado es una célula. Además, analitos adecuados incluyen moléculas orgánicas e inorgánicas, incluyendo biomoléculas. En una realización preferida, el analito es una proteína. Como será apreciado por los expertos en la especialidad, hay un gran número de posibles analitos proteínicos que se pueden detectar o evaluar con respecto a socios de unión usando la presente invención. Además de enzimas como las analizadas anteriormente, analitos proteínicos adecuados incluyen, pero no se limitan a, (1) inmunoglobulinas; (2) hormonas y citocinas (muchas de las cuales sirven como ligandos para receptores celulares); (3) marcadores de cáncer; y (4) otras proteínas.

Según una realización en la que el analito no es una enzima y se realiza un ensayo de tipo sándwich como se describe con más detalle posteriormente, el marcador enzimático que se describe con más detalle posteriormente puede ser β -galactosidasa. Alternativamente, el marcador enzimático puede ser, pero no está limitado a, fosfatasa alcalina o peroxidasa de rábano picante.

Analitos adecuados adicionales incluyen, pero no se limitan a, un contaminante medioambiental (incluyendo plaguicidas, insecticidas, toxinas, etc.); un producto químico (incluyendo disolventes, polímeros, materiales orgánicos, etc.); moléculas terapéuticas (incluyendo fármacos terapéuticos y drogas, antibióticos, etc.); biomoléculas (incluyendo hormonas, citocinas, proteínas, ácidos nucleicos, lípidos, carbohidratos, antígenos y receptores (receptores neurales, hormonales, de nutrientes y de la superficie celular) de la membrana celular y sus ligandos, etc.); células enteras (incluyendo células procarióticas (tales como bacterias patógenas) y eucarióticas, incluyendo células tumorales de mamíferos); virus (incluyendo retrovirus, herpesvirus, adenovirus, lentivirus, etc.); y esporas; etc.

En ciertas realizaciones, el analito puede ser una proteína modificada postraduccionalmente (p. ej., fosforilación, metilación, glicosilación) y el componente de captura puede ser un anticuerpo específico para una modificación postraducciona. Las proteínas modificadas pueden capturarse con una multiplicidad de anticuerpos específicos y a continuación visualizarse con el uso de un anticuerpo secundario específico para una modificación postraducciona. Alternativamente, las proteínas modificadas pueden capturarse con un anticuerpo específico para una modificación postraducciona y a continuación visualizarse con anticuerpos específicos para cada proteína modificada.

En otra realización, el analito es un ácido nucleico. Un ácido nucleico puede capturarse con un ácido nucleico de captura (p. ej., un oligonucleótido) y a continuación visualizarse con un oligonucleótido específicamente marcado diferente.

IV. Marcadores detectables y detección de señales

Se entiende que se puede usar una variedad de marcadores detectables en la práctica de los métodos descritos en la presente memoria. Por ejemplo, se entiende que se puede usar en la práctica de la invención una variedad de marcadores coloreados (por ejemplo, nanopartículas metálicas (por ejemplo, nanopartículas de oro), nanopartículas semiconductoras (por ejemplo, puntos cuánticos), marcadores espectroscópicos (por ejemplo, marcadores fluorescentes), radiomarcadores y marcadores enzimáticos.

Dependiendo del formato de ensayo particular, los marcadores detectables se ligan indirectamente al analito después de que haya sido capturado por el componente de captura, por ejemplo, a través de un ligando de unión secundario que se conjuga a un marcador detectable y se une al analito capturado. Una vez que el marcador se haya ligado al analito, la presencia del marcador se puede detectar usando sistemas de detección adecuados, por ejemplo, detectores ópticos (por ejemplo, cámaras de CCD intensificadas), detectores de fluorescencia conocidos en la especialidad.

En una realización, los marcadores son marcadores enzimáticos. En este caso, un sustrato enzimático cromogénico, fluorogénico o quimioluminiscente se pone en contacto con la enzima para producir un producto detectable. Se entiende en la especialidad que los sustratos enzimáticos cromogénicos, fluorogénicos o quimioluminiscentes son conocidos o se pueden elaborar para muchas enzimas diferentes. Así, se puede usar en la presente invención cualquier sustrato enzimático cromogénico, fluorogénico o quimioluminiscente capaz de producir un producto detectable en una reacción con una enzima particular, incluyendo cualquiera de los sustratos enzimáticos cromogénicos, fluorogénicos o quimioluminiscentes divulgados en *The Handbook-A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies*, Décima Ed., Capítulo 10, <http://probes.invitrogen.com/handbook/sections/1000.html>.

Según una realización en la que el analito se detecta usando un ensayo de tipo sándwich según se describe más a fondo en la presente memoria en el que el marcador enzimático es β -galactosidasa, el sustrato enzimático añadido a la serie es un sustrato para β -galactosidasa tal como resorufina- β -D-galactopiranosido.

V. Métodos de ensayo

Los ensayos de recipientes de reacción de la presente invención se pueden usar para varios métodos de ensayo diferentes. Más específicamente, la presente invención proporciona tanto (a) detección de un analito como (b) cuantificación de la concentración del analito en una muestra.

Generalmente, la serie de micropocillos de la presente invención se expone a un analito de interés (o se pone en contacto con una muestra que contiene un analito de interés) y el analito es capturado por un componente de captura sobre la superficie de unión dentro de cada micropocillo bajo condiciones adecuadas para la captura del analito por al menos uno de los componentes de captura, es decir condiciones generalmente fisiológicas. Para los propósitos de la presente solicitud, el término "inmovilizado" significa capturado, ligado, unido o fijado a un componente de captura sobre la superficie de unión. Por ejemplo, en el contexto del uso de micropocillos, la interacción entre cualquier molécula de analito y el componente de captura sobre la superficie de unión de un micropocillo da como resultado la inmovilización de la molécula de analito dentro de ese micropocillo.

Según un aspecto de la invención, la muestra de interés se pone en contacto con la serie de micropocillos de la presente invención (o la serie de los micropocillos se incuba en la muestra) durante un período de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 12 horas dependiendo de la concentración del analito y el volumen de la muestra. En una realización, la serie de micropocillos y la muestra se ponen en contacto durante un período de aproximadamente 50 minutos a aproximadamente 70 minutos. En una realización adicional, el período de incubación es aproximadamente 1 hora.

Según una realización, se realiza una etapa de lavado después de poner en contacto la serie de micropocillos con la muestra. La etapa de lavado está destinada a separar por lavado cualesquiera analitos o moléculas que no son analito que no estén unidos a un componente de captura. Alternativamente, no se necesita etapa de lavado.

En un aspecto de la invención, se añade a continuación a la serie de micropocillos un ligando de unión secundario. Generalmente, el ligando de unión secundario se añade si el método de detección del analito es un ensayo indirecto tal como un "ensayo de tipo sándwich" (cuando el analito no es una enzima), como se describe con mayor detalle en la presente memoria. El ligando de unión secundario, como se divulga anteriormente, se asociará con o se unirá al analito capturado y comprende un marcador detectable, por ejemplo, un componente enzimático. El ligando de unión secundario se añade en una cantidad suficiente para asegurar que un ligando de unión secundario entre en contacto con cualquier analito unido sobre la superficie de unión de la serie de micropocillos. Alternativamente, no se añade ligando de unión secundario, tal como, por ejemplo, cuando el analito se va a detectar directamente.

Cuando se usan marcadores coloreados y marcadores espectroscópicos, los marcadores se pueden detectar usando un sistema de detección apropiado. En contraste, cuando el marcador es un marcador enzimático, el marcador enzimático se pone en contacto con un sustrato enzimático cromogénico, fluorogénico o quimioluminiscente para producir un producto detectable.

En el caso de los marcadores enzimáticos, un sustrato enzimático cromogénico, fluorogénico o quimioluminiscente como el descrito anteriormente se introduce o se añade a continuación a la serie de micropocillos. El sustrato enzimático cromogénico, fluorogénico o quimioluminiscente se proporciona en una cantidad suficiente para entrar en contacto con cualquier analito capturado que bien sea una enzima en sí mismo o bien esté acoplado a una enzima, por ejemplo, a través de un anticuerpo marcado con enzima. El sustrato enzimático elegido reacciona con o es modificado por el componente enzimático de modo que la reacción produzca un producto cromogénico, fluorogénico o quimioluminiscente y así una señal óptica. La presencia del producto cromogénico, fluorogénico o quimioluminiscente en la serie de recipientes de reacción (como se describe posteriormente) puede proporcionar información acerca de la identidad y/o la concentración de un analito basándose en la interacción del analito con el componente de captura y el sustrato enzimático (y el ligando de unión secundario, en algunos casos).

En una realización de la presente invención, la serie de micropocillos se sella después de que el sustrato enzimático se añada para formar una serie de recipientes de reacción. Esto es, un componente de selladura se pone en contacto con la cara de la serie de micropocillos, aislando hidráulicamente de ese modo cada micropocillo y sellando su contenido en el mismo. Un "componente de selladura", según se usa en la presente memoria, se define como cualquier material o dispositivo suficientemente grande para cubrir toda la serie de micropocillos y capaz de entrar en contacto con la superficie exterior de la serie de micropocillos (por ejemplo, el revestimiento de un haz de fibras ópticas) de modo que cada recipiente de reacción así formado se selle o aisle de modo que el contenido de cada recipiente de reacción no pueda escapar del recipiente de reacción. Según una realización, el componente de selladura es una junta de elastómero de silicona que se sitúa contra la serie de micropocillos con una presión uniforme a través de todo el sustrato. Al sellar el contenido en cada micropocillo, la reacción enzimática puede avanzar dentro del recipiente de reacción así formado, produciendo de ese modo una cantidad detectable del producto cromogénico, fluorogénico o quimioluminiscente que se retiene en el recipiente de reacción con propósitos de detección. Esto es, la enzima convierte el sustrato en producto cromogénico, fluorogénico o quimioluminiscente que se acumula hasta una concentración localmente alta en cada recipiente de reacción sellado, generando una señal cromogénica, fluorogénica o quimioluminiscente detectable.

Según una realización, la presente invención proporciona un sistema de microscópico equipado con una plataforma mecánica que aplica el componente de selladura. La plataforma se sitúa debajo de la platina del sistema microscópico. Después de que el sustrato enzimático se haya añadido a la serie de micropocillos, el componente de selladura se interpone entre una superficie plana (tal como, por ejemplo, un portaobjetos) y la serie de micropocillos usando presión uniforme aplicada por la plataforma mecánica.

Los ensayos para detectar analitos se pueden realizar bajo una variedad de condiciones experimentales, como será apreciado por los expertos en la especialidad. Una variedad de otros reactivos se puede incluir en los ensayos de cribado. Estos incluyen reactivos como sales, proteínas neutras, p. ej. albúmina, detergentes, etc., que se pueden usar para facilitar la unión óptima proteína-proteína y/o reducir las interacciones no específicas o de fondo. Además, se pueden usar reactivos que mejoran de otro modo la eficacia del ensayo, tales como inhibidores de proteasas, inhibidores de nucleasas, agentes antimicrobianos, etc. La mezcla de componentes se puede añadir en cualquier orden que proporcione la unión requerida. Se pueden utilizar diversas etapas de bloqueo y lavado como se conoce en la especialidad.

Los recipientes de reacción que exhiben actividad enzimática o cambios en su firma óptica se pueden identificar mediante un trayecto óptico y un sistema de detección óptica convencionales. Dependiendo de los sustratos enzimáticos particulares usados y las longitudes de onda operativas de sus productos, se pueden emplear filtros ópticos diseñados para longitudes de onda particulares para la interrogación óptica de los recipientes de reacción. En una realización preferida, la serie de recipientes de reacción de la presente invención se forma directamente como parte de un haz de fibras ópticas.

Según una realización, la serie de recipientes de reacción de la presente invención se puede usar junto con un sistema de detección óptica tal como el sistema descrito en la Solicitud de EE. UU. N° 09/816.651. Por ejemplo, según una realización, la serie de recipientes de reacción de la presente invención es el extremo distal de un montaje de fibras ópticas que comprende un haz de fibras ópticas construido de fibras revestidas de modo que la luz no se mezcla entre las fibras. Según se presenta en la Solicitud 09/816.651, el extremo proximal del haz es recibido por una platina de traslación z y un microposicionador x-y.

El sistema de detección óptica de la Solicitud de EE. UU. N° 09/816.651 funciona como sigue. Luz que vuelve desde el extremo distal del haz de fibras ópticas se hace pasar mediante la ligazón a un conmutador de amplificación que permite el ajuste del tamaño de la imagen del extremo proximal o distal de la fibra. A continuación, la luz que pasa a través del conmutador de amplificación se obtura y se filtra mediante una segunda rueda. A continuación, se hace que la luz forme una imagen sobre una cámara de dispositivo acoplado a la carga (CCD). Un ordenador ejecuta un programa de procesamiento de imágenes para procesar la información procedente de la cámara de CCD y también posiblemente controlar las ruedas de obturación y filtración primera y segunda.

La serie de recipientes de reacción de la presente invención puede ser integral o estar ligada al extremo distal del haz de fibras ópticas usando una variedad de procedimientos compatibles. Se forman micropocillos en el centro de cada fibra individual del haz de fibras ópticas y se forman recipientes de reacción sellando esta serie de

micropocillos con un componente de selladura. Así, cada fibra óptica del haz de fibras ópticas transporta luz desde el micropocillo individual formado en el centro del extremo distal de la fibra. Esta característica es necesaria para permitir la interrogación de la firma óptica de recipientes de reacción individuales para identificar reacciones en cada micropocillo. Por consiguiente, formando una imagen del extremo del haz sobre la serie de CCD, las firmas ópticas de los recipientes de reacción son interrogables individualmente.

A. Detección

Como se analizó previamente, el sistema de detección dependerá del marcador que se detecte. Por ejemplo, cuando el marcador es un marcador óptico, un marcador espectroscópico o un radiomarcador, la presencia del marcador se puede determinar usando detectores disponibles comercialmente conocidos en la especialidad.

Cuando el marcador es un marcador enzimático, el marcador se puede detectar directamente (por ejemplo, cuando el analito tiene una actividad enzimática inherente) o indirectamente (por ejemplo, cuando el analito no exhibe actividad enzimática) a través de técnicas conocidas en la especialidad. En otras palabras, si el analito es una enzima, el analito se puede identificar mediante un método de detección directo. Alternativamente, si el analito no es una enzima y así no se puede producir un producto cromogénico, fluorogénico o quimioluminiscente en presencia de un sustrato enzimático, el analito se identifica mediante un método de detección indirecto.

El método de detección directo, que implica un analito que es una enzima, procede como sigue. En primer lugar, la muestra de interés y la serie de micropocillos se ponen en contacto como se describe con más detalle anteriormente bajo condiciones adecuadas. El sustrato enzimático se añade bien simultáneamente con la muestra o bien después de la adición de la muestra.

Después de sellar los micropocillos, la presencia o ausencia del analito en cualquier recipiente de reacción dado se detecta a continuación mediante interrogación óptica. Esto es, se detecta cualquier cambio en la señal óptica provocado por la producción de un producto cromogénico, fluorogénico o quimioluminiscente. En cualquier recipiente de reacción que contenga el analito, el analito modifica o actúa sobre el sustrato enzimático de algún modo, dando como resultado de ese modo la liberación de un producto cromogénico, fluorogénico o quimioluminiscente, dando como resultado un cambio en la señal óptica procedente del recipiente de reacción. A continuación, el producto cromogénico, fluorogénico o quimioluminiscente se detecta ópticamente.

En una realización de la presente invención, la serie de micropocillos se sella con el componente de selladura para formar recipientes de reacción después de que se añada el sustrato enzimático, como se describe anteriormente.

Los métodos de detección indirectos implican un analito que no tiene propiedades enzimáticas. Dos métodos indirectos que se pueden usar con la presente invención son el ensayo "de tipo sándwich" y el ensayo "competitivo". Se contempla que se puedan emplear formatos de ensayo similares cuando los marcadores sean marcadores ópticos, marcadores espectroscópicos y radiomarcadores.

Un ensayo de tipo sándwich se puede realizar como se presenta en la FIG. 2. En primer lugar, la muestra de interés y la serie de micropocillos se ponen en contacto como se muestra en la FIG. 2a y como se describe con más detalle anteriormente. Bajo condiciones adecuadas, el analito presente en la muestra es capturado por los componentes de captura presentados sobre las superficies de unión de los micropocillos, según se muestra en la FIG. 2b. Según una realización, a continuación se realiza una etapa de lavado.

Posteriormente, un "ligando de unión secundario" se añade a la serie de micropocillos, como se muestra en la FIG. 2c. Los ligandos de unión secundarios son similares a los componentes de captura en que se unen al analito. El ligando de unión secundario puede ser igual a o diferente del componente de captura. La unión del ligando de unión secundario a un analito capturado forma una suerte de "sándwich". En ausencia del analito, el ligando de unión secundario se separa por lavado.

Un ligando de unión secundario tiene dos componentes, un componente de unión y un marcador enzimático o un marcador que puede capturar una enzima. El componente de unión es la porción del ligando de unión secundario que se une al analito. Típicamente, el ligando de unión secundario se une a una porción del analito diferente del componente de captura, debido a que si tanto el componente de captura como el ligando de unión secundario se uniera a la misma porción, el ligando de unión secundario no sería capaz de unirse al analito capturado. Así, el ligando de unión secundario elegido se puede unir al analito aunque el analito esté unido a la superficie de unión a través de un componente de captura.

El marcador es la porción del ligando de unión secundario que exhibe actividad enzimática o se puede usar posteriormente para capturar una enzima. Según una realización, el marcador es una enzima ligada al ligando de unión secundario.

Posteriormente, se añade el sustrato enzimático. En una realización de la presente invención, la serie de micropocillos se sella después de que el sustrato enzimático se añada para formar los recipientes de reacción, como se describe anteriormente. La presencia o ausencia del analito en cualquier recipiente de reacción dado se detecta a continuación mediante interrogación óptica. Esto es, se detecta cualquier cambio en la señal óptica provocado por la

producción de un producto cromogénico, fluorogénico o quimioluminiscente. En cualquier recipiente de reacción que contenga el analito y el ligando de unión secundario, la enzima asociada con el ligando de unión secundario modifica o actúa sobre el sustrato enzimático de algún modo, produciendo de ese modo un producto cromogénico, fluorogénico o quimioluminiscente, dando como resultado un cambio en la señal óptica procedente del recipiente de reacción. A continuación, el producto se detecta ópticamente.

El ensayo competitivo funciona como sigue. En primer lugar, una molécula marcada se añade a la serie de micropocillos de la presente invención, donde el marcador es una enzima o un componente enzimático. En esta realización, la molécula marcada elegida se une con el componente de captura de modo que la adición de la molécula marcada a la serie dé como resultado moléculas marcadas que se unen a componentes de captura sobre la superficie de unión de los micropocillos.

Posteriormente, la muestra de interés y la serie de micropocillos se ponen en contacto como se describe con más detalle anteriormente. La presencia del analito en la serie de micropocillos provoca el desplazamiento de la molécula marcada y la unión del analito a los componentes de captura. El desplazamiento se produce por la siguiente razón: en esta realización, el componente de captura elegido es capaz de unirse bien a la molécula marcada o bien al analito, dando como resultado de ese modo una situación de unión competitiva. Como resultado, si una molécula marcada se une a un componente de captura sobre la superficie de unión de un micropocillo y se añade un analito, el analito desplazará la molécula marcada bajo condiciones adecuadas.

Según una realización, a continuación se realiza una etapa de lavado para retirar cualesquiera moléculas marcadas no unidas de la superficie de unión de la serie de micropocillos.

Posteriormente, se añade el sustrato enzimático. Como se analiza anteriormente, según un aspecto de la invención, la serie de micropocillos se sella después de que el sustrato enzimático se añada para formar recipientes de reacción. Alternativamente, la serie de micropocillos no se sella. A continuación, la presencia o ausencia del analito en cualquier recipiente de reacción dado se detecta mediante interrogación óptica. Pero a diferencia de las interrogaciones ópticas que se describen anteriormente, en esta interrogación es la falta de un producto cromogénico, fluorogénico o quimioluminiscente lo que indica la presencia del analito en el recipiente de reacción. En cualquier recipiente de reacción que contenga el analito, no se produce acción enzimática y no se produce cambio en la señal óptica procedente del recipiente de reacción. En contraste, en cualquier recipiente de reacción en el que todavía esté presente la molécula marcada, se detecta una señal óptica.

En una versión alternativa de la realización de ensayo competitivo, tanto la molécula marcada como la muestra de interés se añaden a la serie de micropocillos en el mismo momento en volúmenes fijados. En esta versión, el analito y la molécula marcada compiten directamente por los centros de unión sobre los componentes de captura.

Además, se entiende que los métodos y las composiciones descritos en la presente memoria se pueden usar en una variedad de ensayos múltiples para detectar la presencia de uno o más analitos en una muestra. Ensayos múltiples ejemplares se describen en las siguientes secciones.

1. Múltiples componentes de captura diferentes para el mismo analito diana

La serie de recipientes de reacción de la presente invención según una realización utiliza una pluralidad de componentes de captura que se dirigen a un solo analito diana pero no son idénticos. En otras palabras, los componentes de unión se unen a diferentes centros de unión sobre un analito. Esta realización proporciona así más de un componente de captura diferente sobre cada superficie de unión o componentes de captura diferentes sobre superficies de unión diferentes. En un ejemplo, un solo analito es interrogado por dos o más componentes de captura, cada uno de los cuales es capaz de unirse a diferentes centros sobre el analito. Esto añade al ensayo un nivel de confianza ya que las interacciones de unión no específicas se pueden minimizar estadísticamente. En esta realización, cuando se evalúan analitos proteínicos, realizaciones preferidas utilizan componentes de captura que se unen a partes diferentes de la diana. Por ejemplo, cuando se usan dos o más anticuerpos (o fragmentos de anticuerpo) para diferentes porciones de la misma proteína de analito como componentes de captura, realizaciones preferidas utilizan anticuerpos para diferentes epítomos. De forma similar, cuando se van a evaluar analitos de ácido nucleico, las sondas de ácido nucleico redundantes pueden estar solapadas, adyacentes o separadas espacialmente. Sin embargo, se prefiere que dos sondas no compitan por un solo centro de unión, de modo que se prefieren sondas adyacentes o separadas.

En esta realización, se puede usar una pluralidad de diferentes componentes de captura, prefiriéndose de aproximadamente 2 a aproximadamente 20, y prefiriéndose más de aproximadamente 2 a aproximadamente 10, y prefiriéndose particularmente de 2 a aproximadamente 5, incluyendo 2, 3, 4 o 5. Sin embargo, como anteriormente, también se pueden usar más, dependiendo de la aplicación.

2. Múltiples componentes de captura diferentes para múltiples analitos diana

En otra realización, la serie de recipientes de reacción de la presente invención usa una pluralidad de diferentes componentes de captura que se dirigen a una pluralidad de analitos diana, que pueden ser iguales o diferentes. Esta

realización incluye más de un componente de captura diferente sobre cada superficie de unión o componentes de captura diferentes sobre superficies de unión diferentes. En un ejemplo, se pueden proporcionar dos o más analitos para los que son capaces de unirse dos o más componentes de captura sobre las mismas superficies de unión o sobre superficies de unión diferentes.

- 5 En esta realización, se puede identificar más de un analito. Por ejemplo, se pueden identificar dos o más analitos diana con tal de que, en el caso de los ensayos directos, cada analito diferente sea una enzima diferente o, en el caso de los ensayos indirectos, cada diana se acople a restos de unión conjugados con marcadores diferentes. En una realización, los analitos se identifican usando múltiples sustratos enzimáticos en donde cada sustrato produce un color diferente durante la interacción con la enzima apropiada. Así, cada analito diana se puede distinguir basándose en el color producido por la reacción con el sustrato enzimático. Cuando se usan marcadores diferentes a enzimas, los diferentes marcadores deben tener características diferentes de modo que cada marcador diferente se pueda identificar con el detector apropiado.

- 10 En un enfoque alternativo, denominado un enfoque secuencial, los analitos se identifican usando marcadores iguales o diferentes. En este enfoque, el uno o más analitos de interés se capturan sobre una o más superficies de unión. A continuación, se permite que un primer resto de unión marcado que se une al analito se una a un primer analito inmovilizado. La presencia del marcador se puede detectar con un sistema de detección apropiado. Posteriormente, el primer resto de unión marcado se retira, por ejemplo, mediante lavado. A continuación, se permite que un segundo resto de unión marcado que se une a un segundo analito diferente se una al segundo analito. La presencia del marcador se puede detectar con un sistema de detección apropiado. Posteriormente, el segundo resto de unión marcado puede retirarse mediante lavado y el procedimiento repetirse según se desee. Se entiende que, en este enfoque, se pueden presentar marcadores iguales o diferentes en los restos de unión marcados primero y segundo. Se entiende que todos los marcadores descritos en la presente memoria se pueden usar en este enfoque. Cuando el marcador es una enzima, se entiende que las reacciones secuenciales se pueden realizar usando sustratos, cada uno de los cuales produce colores iguales o diferentes.

- 25 En esta realización, se puede usar una pluralidad de diferentes componentes de captura, prefiriéndose de aproximadamente 2 a aproximadamente 100, y prefiriéndose especialmente de aproximadamente 2 a aproximadamente 20, y prefiriéndose particularmente de 2 a aproximadamente 10, incluyendo 2, 3, 4 o 5, 6, 7, 8, 9. Sin embargo, como anteriormente, también se pueden usar más, dependiendo de la aplicación.

- 30 En otro enfoque, denominado un enfoque espacial, es posible usar bien (i) dos componentes de captura diferentes dispuestos dentro de regiones separadas de una superficie de unión, (ii) bien dos restos de unión marcados diferentes que se aplican a regiones separadas de una superficie de unión, o bien (iii) una combinación de (i) y (ii).

- 35 En el primer ejemplo del enfoque espacial, se aplican componentes de captura diferentes a regiones diferentes de la superficie de unión. Por ejemplo, esto se puede conseguir poniendo microgotículas sobre diferentes regiones de una serie de micropocillos de fibras si se usa como una superficie de unión o al componente de selladura si se usa como la superficie de unión. Cada microgotícula contiene un componente de captura diferente que funcionalizará la superficie con la que contacta con el componente de captura diferente. De este modo, dependiendo del tamaño de las gotículas, es posible formar una serie de componentes de captura diferentes sobre la superficie de unión que son espacialmente discretos. El número de análisis múltiples que se podría detectar de este modo dependerá del tamaño de las diferentes regiones del componente de captura y el tamaño de la serie de recipientes de reacción.

- 40 En el segundo ejemplo del enfoque espacial, se entiende que los analitos de interés pueden ser capturados uniformemente a través de una superficie de unión o dentro de regiones discretas de la superficie de unión. Sin embargo, en este enfoque, un primer resto de unión marcado se aplica a una primera región de la superficie de unión y se detecta la presencia de un primer analito. Simultáneamente o secuencialmente, un segundo resto de unión marcado se aplica a una segunda región de la superficie de unión y se detecta la presencia de un segundo analito.

Se entiende que cada una de las diferentes configuraciones de ensayo anteriores, incluyendo los componentes de captura dirigidos a diferentes analitos y la pluralidad de componentes de captura dirigida al mismo analito, también se pueden utilizar para la cuantificación como se describe posteriormente.

- 50 Además, bajo ciertas circunstancias, se cree que la serie de micropocillos se puede reutilizar durante un ensayo posterior. En este enfoque, se registra en un primer ensayo un logaritmo de los pocillos que contenían analito y a continuación en un ensayo posterior los pocillos que contenían previamente analito se sustraen matemáticamente de la serie de micropocillos usada en el ensayo posterior.

B. Cuantificación

- 55 La invención se puede usar para detectar tanto la presencia como la concentración de un analito en la muestra. Esto es, existe una correlación entre el porcentaje de recipientes de reacción que contienen una o más moléculas de analito y la concentración del analito en la muestra. Así, el método de cuantificación de la presente invención permite

el cálculo de la cantidad de un analito en una muestra basándose en el porcentaje de recipientes de reacción que contienen una molécula de analito.

La presente invención se distingue por su capacidad para cuantificar bajos números de moléculas individuales y, por lo tanto, es muy adecuada para medir concentraciones muy bajas de analito diana. Esta capacidad se alcanza al aislar espacialmente moléculas de analito individuales, por ejemplo, en una serie de recipientes de reacción, y a continuación, opcionalmente, generar y confinar un producto cromogénico, por ejemplo, un marcador fluorescente, en los recipientes de reacción. La presencia de una molécula de analito se puede contar fácilmente de un modo binario (cero cuando está ausente una molécula; uno cuando está presente una molécula) debido a la alta concentración de producto cromogénico en cualquier recipiente de reacción que contenga al menos una molécula de analito.

Sin querer limitarse por una teoría, el método de cuantificación está guiado en parte por el hecho de que el número y el volumen de los recipientes de reacción empleados gobiernan el intervalo dinámico de concentraciones que se puede determinar mediante esta técnica. Esto es, basándose en el número y el volumen de los recipientes de reacción en una serie de la presente invención, se puede hacer una estimación del intervalo de concentraciones de analito diana en solución que permita que la concentración se determine usando el método de la presente invención.

Por ejemplo, para una serie como la divulgada en el Ejemplo 2 con recipientes de reacción que tienen cada uno un volumen de 46 fl, una solución que tenga una concentración de $3,6 \times 10^{-11}$ M de β -galactosidasa dará, de media, una molécula de enzima por recipiente. Sin embargo, es importante apuntar que distribuir una solución que tenga una concentración de analito diana dentro del intervalo apropiado en una serie de recipientes de reacción no dará como resultado la distribución de exactamente una molécula de enzima por recipiente; estadísticamente, algunos recipientes tendrán múltiples moléculas mientras que otros tendrán cero. En caso de que el número de recipientes que contienen una o más moléculas de enzima al número de recipientes que no contienen molécula de enzima sea alto, los datos se pueden ajustar a una distribución gaussiana. Cuando la relación de recipientes de reacción que contienen una molécula de enzima al número de recipientes que no contienen molécula de enzima se aproxime a cero, se aplica la distribución de Poisson. Esta distribución limitativa se usa para calcular la probabilidad de que se produzcan sucesos raros en un gran número de pruebas. Por ejemplo, basándose en la estadística de Poisson, para una concentración de $3,6 \times 10^{-11}$ M, se predice una distribución entre cero y cinco moléculas de enzima por receptáculo, siendo los valores más probables cero y uno. En la presente invención, la concentración del analito se determina mediante un análisis de distribución gaussiano.

La Ecuación 1 se puede usar para determinar la probabilidad de observar v sucesos basándose en el número medio esperado de sucesos por prueba, μ .

$$\text{Ecuación 1: } P_v(v) = e^{-\mu} (\mu^v / v!)$$

Si las concentraciones usadas son mucho menores de $3,6 \times 10^{-11}$ M, la media esperada se hace excepcionalmente baja, la distribución se estrecha y la probabilidad de observar cualquier otra cosa que 0 o 1 suceso por prueba es improbable en todos los casos experimentales. A estas concentraciones bajas, la relación entre el porcentaje de recipientes de reacción activos y la concentración aparente de enzima es aproximadamente lineal. Así, basándose en este conocimiento, la serie de la presente invención se puede usar para determinar la concentración de un analito diana en una muestra mediante un sistema de lectura digital simple, es decir, "recuento" de pocillos activos, como se describe en la presente memoria.

Según una realización, el método de cuantificación de la presente invención se puede realizar como sigue. El método es un sistema de lectura digital (también denominado un "sistema de lectura binario") que incluye en primer lugar detectar los analitos en la serie de recipientes de reacción mediante cualquier método de detección descrito anteriormente. A continuación, se cuenta el número de recipientes de reacción y se calcula un porcentaje del número total de recipientes de reacción. Esto es, la utilización de una respuesta positiva o negativa, junto con la serie de alta densidad de recipientes de reacción, permite la lectura digital de concentraciones aparentes de moléculas de analito marcadas con un marcador de interés, por ejemplo, la enzima β -galactosidasa. Esta lectura se efectúa contando los recipientes que contienen una molécula de enzima activa a través de la serie, correlacionando el porcentaje de "pocillos activos" resultante con la concentración de analito suponiendo un marcador enzimático por molécula diana. Dado el gran número de recipientes simultáneamente interrogados en la serie de la presente invención, la relación de moléculas de enzima a recipientes de reacción podría ser 1:1.000 o menos, ya que el gran número de pocillos proporciona una señal estadísticamente significativa incluso con esta relación baja.

Sin querer limitarse por una teoría, se cree que el método de cuantificación de la presente invención sólo está limitado por el número de recipientes de reacción individuales que se puede fabricar e interrogar. Así, aumentar el número de recipientes de reacción incrementará tanto el intervalo dinámico como la sensibilidad del ensayo.

Las limitaciones de esta técnica se observan por encima y por debajo de los umbrales del intervalo dinámico. Cuando la concentración cae por debajo del límite inferior del intervalo dinámico, el número de moléculas de enzima es demasiado bajo para observar suficientes pocillos ocupados y, por lo tanto, el número de pocillos se debe incrementar a fin de asegurar que un número estadísticamente significativo de ellos esté ocupado por moléculas de

enzima. Los resultados para concentraciones extremadamente diluidas tienen grandes errores relativos asociados con ellas, debido al número muy pequeño de recipientes de reacción que se espera que muestren actividad. Una ligera desviación del valor de Poisson esperado, en este caso, dará como resultado un gran error. El límite superior final para esta técnica se produce cuando 100% de los recipientes de reacción contienen al menos una molécula de enzima. Con este límite, no es factible una discriminación entre dos soluciones de altas concentraciones de enzima.

En el intervalo en el que la fracción de recipientes de reacción que contienen al menos una molécula es menor de aproximadamente 20%, la probabilidad de que cualquier pocillo contenga dos o más moléculas de analito es muy pequeña y el número de moléculas de analito se ajusta mucho al número de recipientes de reacción ocupados. Entre 20% ocupado y 100% ocupado, un número de pocillos creciente contendrá más de una molécula, sin embargo, todavía se puede usar una estadística gaussiana para correlacionar la fracción de ocupación con la concentración hasta que la fracción de ocupación alcance 100%.

En la práctica, la señal no específica crea un "suelo de ruido" inferior y los recipientes de reacción fallidos crean un "techo de ruido" superior. Por otra parte, con referencia al número de pocillos ocupados o no ocupados por analito, la ocupación estadísticamente significativa se puede determinar usando métodos estadísticos estándar conocidos en la especialidad. Por ejemplo, una medida estadísticamente significativa puede ser una que es tres veces la desviación estándar de la media.

Si se desea, el intervalo dinámico práctico del método se puede incrementar de varios modos. En un enfoque, la muestra se diluye en un factor de 10 o más. Tanto la muestra como la muestra diluida se pueden ensayar paralelamente usando el método de esta invención. Los intervalos dinámicos de los dos ensayos se solapan, pero estarán desplazados por el factor de dilución, extendiendo de ese modo el intervalo dinámico.

En un segundo enfoque, la cantidad de firma en cada recipiente de reacción se mide en múltiples puntos temporales antes del momento en el que todos los recipientes de reacción sean positivos con respecto al analito. La fracción de pocillos que son positivos en cada punto temporal inicial se puede calibrar contra un patrón de referencia conocido para determinar la concentración de la muestra que se analiza. En la realización de la invención que utiliza un haz de fibras ópticas y una cámara de CCD, es sencillo formar imágenes de todos los pocillos en tiempo casi real.

En un tercer enfoque, se pueden usar múltiples series de recipientes de reacción con diferentes volúmenes, diferentes áreas de superficie de unión o diferente densidad de concentración de componentes de captura sobre la superficie de unión. Estas series se pueden construir bien como series distintas o bien como una serie grande con subseries con características variables. Puesto que la probabilidad de que una molécula de analito se detecte en un recipiente de reacción dado está relacionada con el volumen, la superficie de unión y la densidad del componente de captura, las subseries se pueden diseñar para cubrir diferentes intervalos de sensibilidad. Si esos intervalos se solapan, el intervalo eficaz de la serie combinada se puede extender.

En una realización, más de aproximadamente 20% pero menos de aproximadamente 60% del número total de pocillos contiene al menos una molécula. Bajo estas circunstancias, el número de pocillos que contienen al menos una molécula está dentro del intervalo no lineal de una distribución de Poisson. En otra realización, más de aproximadamente 20% pero menos de aproximadamente 60% del número total de pocillos contienen aproximadamente una molécula. En otra realización, más de aproximadamente 60% pero menos de aproximadamente 95% del número total de pocillos contienen al menos una molécula. Bajo estas circunstancias, el número de pocillos que contienen al menos una molécula está dentro del intervalo altamente no lineal de una distribución de Poisson. En otra realización, más de aproximadamente 60% pero menos de aproximadamente 95% del número total de pocillos contienen aproximadamente una molécula. En la presente invención, la concentración del analito se determina mediante un análisis de distribución gaussiano.

En un aspecto de la presente invención, la serie también se puede usar para analizar la cinética enzimática. "Cinética enzimática", según se usa en la presente memoria, se refiere al estudio de las velocidades de reacciones controladas por enzimas. Se entiende en la especialidad de la cinética enzimática que la velocidad de una reacción enzimática a bajas concentraciones de sustrato es proporcional a la concentración de sustrato (es "dependiente del sustrato"). Esto se denomina primer orden. Se entiende además que la velocidad de la reacción a altas concentraciones de sustrato alcanza una velocidad máxima y es independiente de la concentración de sustrato debido a que la reacción se satura. Así, si la velocidad de reacción se representa como una función de la concentración de sustrato, la línea inicialmente se incrementa linealmente con un incremento en el sustrato y a continuación empieza a nivelarse a medida que la concentración de sustrato alcanza la saturación.

Así, según una realización, la cinética de cualquier enzima particular se puede estudiar usando el sistema y la serie presentes. La velocidad de reacción varía a través de las enzimas por diversas razones, incluyendo, por ejemplo, la inhibición de la reacción provocada por inhibición alostérica. La serie de la presente invención permite el estudio de estas características cinéticas variadas.

Según una realización, la cinética se examina del siguiente modo. Se deja que el analito diana se una al componente de captura, se añade el sustrato y el recipiente de reacción se sella. Dado que está presente en el recipiente de reacción una cantidad finita de sustrato y no se puede añadir sustrato adicional debido a la selladura

del recipiente, la velocidad de reacción se puede determinar basándose en la cantidad de producto cromogénico detectada a lo largo del tiempo.

VI. Usos ejemplares de la presente invención

- El sistema y la serie de la presente invención tienen muchos usos. Por ejemplo, la serie tiene aplicación a estudios enzimológicos fundamentales, así como medidas digitales de la concentración. Además, la serie permite estudios con múltiples enzimas diferentes y extiende los límites de la detección ultrabaja de dianas proteínicas y de ADN. Con la capacidad para controlar simultáneamente una gran serie de recipientes de reacción, se puede usar enzimología de moléculas individuales para resolver el comportamiento de una molécula de enzima individual a partir de una señal cinética aparente.
- Otro uso, por ejemplo, es el control medioambiental de bacterias o virus o ambos. Una muestra ambiental que contiene potencialmente ciertas bacterias se puede poner en contacto con una serie de la presente invención. Para detectar las bacterias, las células bacterianas se someten a lisis y una enzima (o más de una enzima) bacteriana se elige para la detección. Según una realización, las células se someten a lisis antes de añadirse a la serie. Alternativamente, las células son capturadas y se produce una etapa de lisis sobre la serie antes de la detección. En una alternativa adicional, puede no ser necesaria la lisis si se elige un marcador superficial. Por ejemplo, las bacterias o los virus de interés se pueden capturar con un anticuerpo que es específico para un marcador superficial sobre la diana, y a continuación se puede detectar la captura con un ensayo de tipo sándwich al añadir un anticuerpo marcado con enzima que se une a la diana en otra posición.
- Otro uso, por ejemplo, implica medir la expresión génica. En una realización, los analitos diana son células y estas se introducen en los recipientes de reacción de la serie bajo condiciones tales que algunos recipientes de reacción contengan células individuales. Esta es la primera etapa para medir la expresión génica, que se puede realizar si se desea a nivel de células enteras al detectar proteínas superficiales y proteínas secretadas. Alternativamente, las células se pueden someter a lisis y los transcritos (u otros componentes) procedentes de las células se pueden interrogar. En una realización, cada centro contiene uno o ningún transcrito. En una realización, se comparan células normales y cancerosas. La variación de célula a célula en la expresión génica se puede tratar al examinar la expresión génica a nivel de células individuales.

Ejemplos

Ejemplos de referencia

Ejemplo 1

- En este ejemplo, se realiza un ensayo de unión demostrativo preliminar usando amplificación de señales enzimáticas en una serie recipientes de reacción de tamaño de femtolitros. Más específicamente, se realizan diversos ensayos para detectar cantidades variables de estreptavidina- β -galactosidasa (S β G) en solución usando una serie biotinilada de la presente invención y a continuación se examina la correlación entre el número de pocillos con moléculas de S β G capturadas y la concentración de la S β G en la muestra.
- En este ejemplo, se usa una serie de fibras ópticas mordentada para crear una colección de recipientes de reacción de tamaño de femtolitros, cada uno específicamente funcionalizado y capaz de capturar moléculas diana marcadas con enzima. Moléculas de enzima individuales se confinan en recipientes de reacción individuales y catalizan la producción de un número suficiente de moléculas de producto fluorescente para generar una señal positiva. A bajas concentraciones de molécula diana, solo un porcentaje de los centros de captura se une a una molécula diana, permitiendo una lectura binaria de la concentración de diana a partir de la serie de alta densidad.

Materiales

- Las series de recipientes de reacción en este ejemplo se generan usando un mordentado al ácido de la cara distal de una serie de fibras ópticas de 1 mm pulida, que consiste en 24.000 fibras ópticas individuales de 4,5 μ m. El material central de las fibras es sílice, y el revestimiento alrededor de cada fibra es sílice impurificada con germania, que se mordenta a una velocidad más lenta. Las fibras de 4,5 μ m se mordentan hasta una profundidad de 2,9 μ m, creando una serie de recipientes reactores, cada uno con un volumen de 46 fl (véase la Figura 1a).
- Las fibras se modificaron en primer lugar con un aminopropilsilano unido a las superficies tanto central como de revestimiento (véase la Figura 1b). Para evitar la ligazón de biotina al revestimiento, las fibras aminosilanizadas se pulieron durante 10 segundos con una película de recubrimiento de 0,3 μ m, que retiraba la capa de revestimiento aminosilanizada superior de la serie de fibras (véase la Figura 1c). Después del pulido, se ligó NHS-biotina a los grupos amino sobre las superficies de los pocillos (véase la Figura 1d).

Métodos

En primer lugar, se probó la eficacia del componente de captura. Para probar la eficacia de la biotilación del sustrato, estreptavidina Alexa Fluor 568® se ligó directamente a los grupos biotina sobre las superficies de una fibra tanto pulida como no pulida, seguido por adquisición de imágenes de la superficie modificada (véase la FIG. 3). La FIG. 3 muestra estreptavidina Alexa Fluor 568® que se une a (a) una serie de fibras ópticas modificadas con biotina no pulidas y (b) una serie de fibras ópticas modificadas con biotina pulidas. Como se observa en la imagen (a), la unión a estreptavidina se produjo sobre todas las superficies, en comparación con la imagen (b), donde la unión se produjo solamente sobre las superficies de los reactores de micropocillo. Así, la fibra no pulida muestra colorante sobre toda la serie incluyendo la superficie de revestimiento, mientras que la fibra pulida muestra colorante localizado solamente sobre las superficies de los pocillos.

Después de la modificación de las series, las series de fibras biotiladas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente en 150 µl de tampón de PBS que contenía cantidades variables de SβG. La concentración de la SβG se eligió de modo que durante el tiempo de incubación, estadísticamente, bien una molécula o bien ninguna molécula se uniera a cada pocillo. A continuación, las series se lavaron repetidamente en tampón de PBS, para asegurar que la diana no unida se retirara.

Para una lectura binaria de la unión de SβG, la serie de fibras se cargó y se aseguró sobre un sistema microscópico convencional equipado con una plataforma mecánica. Una solución de sustrato para β-galactosidasa, resorufina-β-D-galactopiranosido (RDG), se introdujo en el extremo distal de la fibra que contenía los recipientes de reacción, y posteriormente se selló. El sustrato se selló usando una junta de elastómero de silicona de 0,025 cm (0,01 pulgadas) de grosor intercalada entre un portaobjetos y la serie de fibras por medio de una plataforma mecánica situada bajo la platina. Esta plataforma aplicó una presión uniforme al material de la junta, a través de todo el haz, sellando cada cámara de reacción y permitiendo la interrogación pocillo a pocillo de la actividad enzimática, la β-galactosidasa hidroliza el RDG para formar resorufina, que se acumula hasta una concentración localmente alta en cada recipiente de reacción sellado, generando una señal fluorescente detectable (Figura 4).

La FIG. 4 representa una porción de la serie de fibras para cada experimento. Cada uno de los experimentos probó una muestra diferente que tenía una concentración diferente de SβG. Las concentraciones para cada experimento eran como sigue: (a) 128 amol, (b) 51 amol, (c) 25 amol, (d) 7,5 amol y (e) 2,6 amol. La FIG. 4(f) representa la referencia.

El análisis de más de 5.000 recipientes de reacción para cada experimento permitió una correlación entre el porcentaje de recipientes de reacción que capturaban una molécula de enzima y la cantidad de enzima presente en la muestra interrogada. Lo más probablemente, la variación observada en las diferencias de intensidad de pocillo activo a pocillo activo es un resultado de la variación de molécula a molécula en la actividad catalítica, en combinación con efectos superficiales, que puede modular las actividades relativas de moléculas de enzima basándose en su orientación con respecto a la superficie de la cámara de reacción.

También se efectuaron dos experimentos de referencia para asegurar que la unión de la enzima a la superficie de los reactores se basara exclusivamente en la interacción biotina-estreptavidina, y no en la unión no específica a la superficie de vidrio. Un experimento de referencia consistía en una fibra no modificada mordentada incubada con la solución diana de SβG más concentrada (128 amol en 150 µl). El segundo experimento de referencia se realizó usando la fibra modificada incubada en una solución de β-galactosidasa que carecía de estreptavidina (128 amol en 150 µl). Ambos experimentos de referencia generaban un porcentaje de pocillos activos insignificante (menos de 0,06%, frente a 0,2% para el experimento de 2,6 amol analizado posteriormente).

Resultados

La FIG. 5 representa una gráfica doblemente logarítmica de los moles de diana presentes en una muestra con el porcentaje resultante de recipientes de reacción activos. La relación lineal entre el porcentaje de recipientes de reacción activos y los moles de diana en la gráfica doblemente logarítmica mostrada en la FIG. 5 sugiere que se puede usar un método de detección de lectura binaria para la detección de dianas reales tales como ADN y antígenos. Este método permite un análisis rápido y una información exacta de la concentración a través de una lectura digital, mientras se mantiene un procedimiento de ensayo sencillo.

También es interesante apuntar que el límite de detección inferior (LOD, por sus siglas en inglés) para unir estreptavidina-β-galactosidasa (SβG) a una serie en un volumen de femtolitros biotilada en este ejemplo era 2,6 amoles (150 µl de solución 17 fM) usando un tiempo de incubación de la diana de 1 hora.

Ejemplo 2

En este ejemplo, se controlaron moléculas de β-galactosidasa individuales usando un haz de fibras ópticas de 1 mm de diámetro con más de $2,0 \times 10^5$ reactores de micropocillo de volumen de femtolitros sellados individualmente. Al observar la acumulación de productos fluorescentes procedentes de la catálisis de moléculas de enzima individuales sobre la serie de recipientes de reacción y al aplicar un análisis estadístico de Poisson, se obtuvo una lectura digital de la concentración.

Materiales

Fibras ópticas de 4,5 μm en un haz de 1 mm se adquirieron de Illumina (San Diego, CA), la β -galactosidasa y el $\text{Ru}(\text{bpy})_3\text{Cl}_2$ se obtuvieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). El resorufina-D- β -galactopiranosido se adquirió de Molecular Probes (Eugene, OR). Material de envuelta de silicona de brillo no reforzado de 0,025 cm (0,01 pulgadas) se adquirió de Specialty Manufacturing Inc. (Saginaw, MI). Todos los otros productos químicos eran de calidad para reactivos y se obtuvieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

Un sistema de obtención de imágenes de epifluorescencia convencional fabricado de encargo adquirió todas las imágenes de fluorescencia usando una fuente de luz de mercurio, ruedas filtrantes de excitación y emisión, objetivos de microscopio y una cámara de CCD (QE, Sensicam). Las ruedas filtrantes y los obturadores se controlaron informáticamente y el análisis se realizó con el programa IPlab (Scanalytics, Fairfax, VA). El sistema estaba equipado con un dispositivo de sujeción para fijar la serie de fibras ópticas sobre el sistema a lo largo de todo el experimento. Se usó una plataforma mecánica bajo la platina para alojar la capa de selladura de silicona, que posteriormente se puso en contacto con el extremo distal de la serie de fibras, sellando cada recipiente de reacción. Todas las medidas se realizaron con series de femtopocillos en el extremo distal del haz de fibras ópticas.

Se usaron haces de fibras ópticas que contenían aproximadamente $2,4 \times 10^5$ fibras ópticas de 4,5 μm de diámetro individuales como el sustrato para fabricar series de recipientes de reacción de volúmenes de femtolitros. El volumen de los pocillos se puede controlar precisamente, ya que la profundidad del mordentado varía con el tiempo de mordentado y la concentración del reactivo de mordentado. Las fibras ópticas usadas en estos experimentos se mordentaron hasta una profundidad de aproximadamente 2,9 μm , dando un volumen de pocillos de 46 fl. La FIG. 6 representa imágenes de la superficie mordentada de los haces de fibras ópticas. Más específicamente, la FIG. 6a representa toda la serie de fibras e imágenes de microscopio ampliadas del haz de fibras, poniendo énfasis en la regularidad tanto de la serie como de cada fibra óptica individual. Además, la FIG. 6b es una imagen de AFM de una porción de la superficie mordentada, que muestra pocillos creados a partir del procedimiento de mordentado.

Métodos

Ensayo. Para el ensayo de β -galactosidasa, el sustrato usado era resorufina- β -D-galactopiranosido. Después de que los pocillos individuales de la serie se sellaran en presencia de enzima y sustrato, se controló la intensidad de fluorescencia a través de la serie de recipientes para el producto enzimático, resorufina (ex. 558 nm / em. 573 nm). Se preparó una solución 100 μM de resorufina-D- β -galactopiranosido (RDG) en tampón de Tris 100 mM pH 8,0 que contenía KCl 2,0 mM y MgCl_2 0,1 mM. Todas las soluciones de enzima se prepararon a partir de muestras de reserva previamente divididas en partes alícuotas y congeladas en el mismo tampón de reacción. Justo antes de la experimentación, las dos muestras se centrifugaron durante 2 min. a 7.000 RPM para retirar cualquier material en partículas que pudiera interferir con la mecánica del sello de silicona. Aproximadamente 1 cm^2 de silicona y un portaobjetos se limpiaron con etanol absoluto. La envuelta de silicona se puso sobre la superficie del vidrio, a la que se adhirió. Posteriormente, volúmenes de 75 μl de enzima y soluciones de RDG se mezclaron sobre la junta de silicona usando una pipeta. La junta se levantó mecánicamente hacia el extremo distal del haz de fibras hasta que experimentó resistencia, sugiriendo que se formaba un sello. Se adquirió una imagen de fluorescencia inicial, seguido por una adquisición de imágenes periódicas durante aproximadamente 2 h.

Componente de selladura. Para sellar la serie de volumen de femtolitros, una junta de elastómero de silicona de 0,025 cm (0,01 pulgadas) se intercaló entre un portaobjetos y la serie de fibras usando una plataforma mecánica. Esta plataforma aplicaba presión uniforme al material de la junta, a través de todo el haz, sellando cada micropocillo para crear los recipientes de reacción.

Se inspeccionó la capacidad de selladura del sello de silicona/vidrio usada para crear y aislar los receptáculos con volumen de femtolitros al realizar un experimento de fotoblanqueo (véase la Fig. 7). La FIG. 7 representa el cierre de una solución en las microcámaras y la evaluación de la integridad del sello de silicona. La FIG. 7a representa una solución de $\text{Ru}(\text{bpy})_3\text{Cl}_2$ encerrada en la serie de cámaras según se observa mediante la fluorescencia roja a través de la serie. La FIG. 7b representa una pequeña porción octogonal del haz de fibras que se fotoblanqueó a través de luz UV. La FIG. 7c representa la serie 60 minutos después. Como se muestra en la figura, la difusión de $\text{Ru}(\text{bpy})_3\text{Cl}_2$ de un pocillo a otro como resultado de un sello de silicona imperfecto presentaría una intensidad de fluorescencia incrementada en los pocillos fotoblanqueados y no se observó. Este experimento sustentó la integridad del sello con respecto a su capacidad para aislar satisfactoriamente la serie de recipientes. La desnaturalización de moléculas de enzima sobre la superficie de vidrio se evitó al bloquear con un tampón de bloqueo de BSA. Las relaciones de enzima a recipiente variaban de 1:5 hasta 1:500, alcanzando una detección exacta a lo largo de dos órdenes de magnitud.

Experimento de fotoblanqueamiento. Se usó una solución de $\text{Ru}(\text{bpy})_3\text{Cl}_2$ 1 mM en agua destilada para los experimentos de fotoblanqueamiento. Un trozo de silicona, aproximadamente 1 cm, y un portaobjetos se limpiaron con etanol absoluto usando torundas libres de borra. La envuelta de silicona se puso sobre la superficie del vidrio, a la que se adhirió. Se pusieron sobre la silicona 50 μl de la solución de $\text{Ru}(\text{bpy})_3\text{Cl}_2$, y posteriormente se puso en contacto con el haz de fibras, para encerrar la solución en los recipientes individuales. Usando un limitador de campo en el sistema de obtención de imágenes, se usó luz UV para iluminar una pequeña porción de la serie

durante 10 minutos, fotoblanqueando el $\text{Ru}(\text{bpy})_3\text{C}_2$. A continuación, el limitador de campo se abrió y se adquirió una imagen, presentando la diferencia en la fluorescencia. A continuación, se dejó que la serie reposara con el sello mantenido. Se tomó una imagen final después de 60 minutos, confirmando la integridad del sello.

Como se analiza anteriormente, el número y el volumen de los recipientes de reacción empleados gobiernan el intervalo dinámico de concentraciones que se puede determinar mediante esta técnica. Los volúmenes de los recipientes de reacción empleados en este ejemplo fueron 46 fl (véase posteriormente); por lo tanto, se calculó que una solución de β -galactosidasa $3,6 \times 10^{-11}$ M dará, de media, una molécula de enzima por recipiente. Como también se analiza anteriormente, si las concentraciones usadas eran mucho menores de $3,6 \times 10^{-11}$ M, el promedio esperado se hace excepcionalmente bajo, la distribución se estrecha y la probabilidad de observar sucesos distintos a 0 o 1 por prueba es improbable en todos los casos experimentales. A estas concentraciones bajas, la relación entre el porcentaje de recipientes de reacción activos y la concentración aparente de enzima es aproximadamente lineal. Después de esperar un tiempo suficiente para permitir que se produjera la catálisis enzimática, los recipientes individuales se interrogaron para una respuesta positiva/negativa, que se correlaciona con que cada recipiente posea o carezca de actividad enzimática.

El sustrato resorruфина-D- β -galactopiranosido (RDG) se usó como el sustrato para los experimentos, que se selló en todos los recipientes, junto con las moléculas de enzima atrapadas, usando un material de junta de silicona y un brazo mecánico. Los porcentajes esperados de pocillos activos se calcularon para cada concentración usada al aplicar la estadística de distribución de Poisson.

Resultados

Como se muestra en la FIG. 8, para el ensayo de β -galactosidasa, diferentes concentraciones aparentes de enzima en solución corresponden a diferentes relaciones de enzima a volumen de recipiente, dando como resultado una variación en el porcentaje de recipientes que contienen una molécula de enzima. La Figura 8 representa la detección de la actividad de moléculas individuales de β -galactosidasa. La FIG. 8a es una imagen de fondo de una porción de la serie, mientras que la FIG. 8b representa una imagen tomada de una porción de un ensayo de enzima a recipiente 1:5, y la FIG. 8c muestra un ensayo de enzima a recipiente 1:80.

La Tabla 1 es una comparación de cada resultado experimental con el porcentaje de recipientes ocupados calculado a partir de la distribución de Poisson. Como se muestra por los datos de la tabla, las medidas de las series se correlacionan satisfactoriamente con el número de moléculas individuales de enzima β -galactosidasa a lo largo de todo el intervalo de concentraciones interrogadas. Existe una pequeña disparidad en las señales observadas como resultado de la variación de molécula a molécula en la actividad catalítica. Lo más probablemente, este resultado se debe a la naturaleza estocástica inherente de las enzimas, además de los efectos superficiales, dando como resultado una modulación de la actividad enzimática.

TABLA 1 – Lectura digital de concentraciones de enzima

Relación enzima a pocillo	Concentración (M)	% Poisson de pocillos activos	% Activos real
1:5	7,20E-12	18,2	14,9
1:10	3,60E-12	9,5	11,5
1:20	1,80E-12	4,9	5,6
1:40	9,00E-13	2,5	3,5
1:80	4,50E-13	1,2	1,5
1:100	3,60E-13	1,0	1,1
1:200	1,80E-13	0,5	0,3
1:500	7,20E-14	0,2	0,1

Tabla 1. Lectura digital de las series. El porcentaje real de cámaras que exhiben actividad, en comparación con el porcentaje esperado calculado a partir de la distribución de Poisson, se listan las diversas concentraciones analizadas.

La variación entre los resultados calculados y experimentales se puede atribuir a la variabilidad intrínseca asociada con la distribución de probabilidades, así como el error experimental en la preparación de soluciones de enzima.

Ejemplo 3

En este ejemplo, se realiza un ensayo de tipo sándwich demostrativo preliminar para detectar una proteína diana no enzimática usando una serie de recipientes de reacción de tamaño de femtolitros (véase la Figura 9). Más específicamente, se realizaron diversos ensayos para detectar cantidades variables de proteína 10 inducible por interferón (IP-10) en solución usando una serie con el componente de captura, un anticuerpo anti-IP-10, dispuesto sobre la superficie de los recipientes de reacción. La IP-10 diana capturada se marcó a continuación con un ligando de unión secundario (anti-IP-10 marcado con biotina) y β -galactosidasa conjugada a estreptavidina (S β G). Se examinó la correlación entre el número de pocillos con moléculas de S β G capturadas y la concentración de IP-10 en la muestra.

Materiales

Las series de recipientes de reacción se generaron en este ejemplo usando un mordentado al ácido de la cara distal de una serie de fibras ópticas de 1 mm pulida, que consistía en 24.000 fibras ópticas de 4,5 μ m individuales. El material central de la fibra era sílice, y el revestimiento alrededor de cada fibra era sílice impurificada con germania, que se mordenta a una velocidad inferior. Las fibras de 4,5 μ m se mordentaron hasta una profundidad de 2,9 μ m, creando una serie de recipientes reactores, cada uno con un volumen de 46 fl (véase la Figura 1a).

Las fibras se modificaron en primer lugar con un aminopropilsilano (véase la Figura 1b). Estas fibras que presentan amina se hicieron reaccionar a continuación con carbonato de N,N'-disuccinimidilo (DSC) 100 mM para activarlas con un éster de succinimida. Los sustratos resultantes se hicieron reaccionar a continuación con 0,1 mg/ml de anticuerpo de captura anti-IP-10 y se lavaron.

Métodos

Después de la modificación de las series, las series de fibras que tenían un anticuerpo anti-IP-10 dispuesto sobre las mismas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente en 150 μ l de tampón de PBS que contenía cantidades variables de IP-10. Las series de IP-10 capturadas se incubaron a continuación con 2 μ g/ml de un ligando de unión secundario, es decir, la detección de anticuerpo anti-IP-10 marcado con biotina. A continuación, estas series se incubaron con 300 pM de S β G para marcar las moléculas de IP-10 unidas con enzima. A continuación, estas series se lavaron repetidamente después de cada incubación en tampón de PBS, para asegurar que se retirara la diana no unida, el anticuerpo y S β G.

Para una lectura binaria de S β G unida a IP-10, la serie de fibras se cargó y se aseguró sobre un sistema de microscopio convencional equipado con una plataforma mecánica. Una solución de sustrato para β -galactosidasa, resorufina- β -D-galactopiranosido (RDG), se introdujo en el extremo distal de la fibra que contenía los recipientes de reacción, y posteriormente se selló. El sustrato se selló usando una junta de elastómero de silicona de 0,025 cm (0,01 pulgadas) intercalada entre un portaobjetos y el haz de fibras por medio de una plataforma mecánica situada bajo la platina. Esta plataforma aplicaba una presión uniforme al material de la junta, a través de todo el haz, sellando cada cámara de reacción y permitiendo la interrogación pocillo a pocillo de la actividad enzimática, la β -galactosidasa hidroliza RDG para formar resorufina, que se acumula hasta una concentración localmente alta en cada recipiente de reacción sellado, generando una señal fluorescente detectable.

El análisis de más de 5.000 recipientes de reacción para cada experimento permitió una correlación entre el porcentaje de recipientes de reacción que capturaba una molécula de enzima y la cantidad de IP-10 presente en la muestra interrogada

Resultados

La FIG. 10 reproduce una gráfica de la concentración de IP-10 presente en una muestra con el porcentaje resultante de recipientes de reacción activos. La relación lineal entre el porcentaje de recipientes de reacción activos y la concentración de diana en la grafica mostrada en la FIG. 10 sugiere que se puede usar un método de detección de lectura binaria para la detección de dianas proteínicas no enzimáticas usando un enfoque de detección de tipo sándwich.

Bibliografía

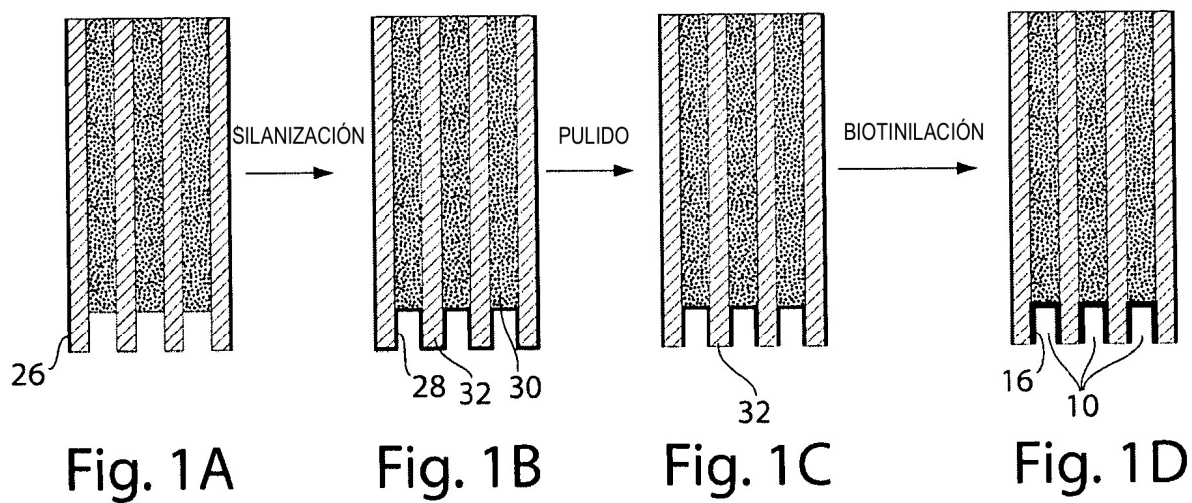
Sano, T.; Smith, C. L.; Cantor, C. R. Science **1992**, 258, 120-122.

Nam, J. M.; Thaxton, C. S.; Mirkin, C. A. Science **2003**, 301, 1884-1886.

- Niemeyer, C. M.; Adler, M.; Pignataro, B.; Lenhert, S.; Gao, S.; Chi, L. F.; Fuchs, H.; Blohm, D. *Nucleic Acids Research* **1999**, 27,4553-4561.
- Zhou, H.; Fisher, R. J.; Papas, T. S. *Nucleic Acids Research* **1993**,21, 6038-6039.
- Niemeyer, C. M.; Adler, M.; Wacker, R. Trends in Biotechnology **2005**,23, 208-216.
- 5 Whitesides, G. M. Nature Biotechnology **2003**, 21, 1161-1165.
- Rondelez, Y.; Tresset, G.; Tabata, K. V.; Arata, H.; Fujita, H.; Takeuchi, S.; Noji, H. *Nature Biotechnology* **2005**, 23, 361-365.
- Nakano, M.; Komatsu, J.; Matsuura, S.; Takashima, K.; Katsura, S.; Mizuno, A. *Journal of Biotechnology* **2003**,102, 117-124.
- 10 Nagai, H.; Murakami, Y.; Yokoyama, K.; Tamiya, E. Biosensors and Bioelectronics **2001**,16,1015-1019.
- Lipman, A. E.; Shuler, B.; Bakajin, O.; Eaton, W. A. Science **2003**, 301, 1233-1235. Chiu, D. T.; Wilson, C. F.; Ryttsen, F.; Stromberg, A.; Farre, C.; Karlsson, A.;
- Nordholm, S.; Gaggar, A.; Modi, B. P.; Moscho, A.; Garza-López, R. A.; Orwar, O.; Zare, R. N. *Science* **1999**, 283, 1892-1895.
- 15 Rissin, D. M.; Walt, D. R. Journal of the American Chemical Society **2007**, 128(19) 6286-6287.
- Pantano, P.; Walt, D. R. *Chemistry of Materials* **1996**, 8, 2832-2835. Monk, D. J.; Ueberfeld, J.; Walt, D. R. *Journal of Materials Chemistry* **2005**,15, 4361-4366.
- Song, L. N.; Ahn, S.; Walt, D. R. *Emerging Infectious Diseases* **2005**,11, 1629-1632. Lee, J. Y.; Li, H. W.; Yeung, E. S. *Journal of Chromatography A* **2004**,1053, 173-179. Xue, Q. F.; Yeung, E. S. *Nature* 1995, 373, 681-683.
- 20 Foquet, M.; Korlach, J.; Zipfel, W. R.; Webb, W. W.; Craighead, H. G. *Analytical Chemistry* **2004**, 76, 1618-1626.
- Gratzl, M.; Lu, H.; Matsimoto, T.; Yi, C.; Bright, G. R. *Analytical Chemistry* **1999**, 71, 2751-2756.

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar la concentración de un analito en una muestra de fluido que se va a probar, comprendiendo el método las etapas de:
 - (a) distribuir al menos una porción de las moléculas de analito en la muestra de fluido a través de una pluralidad de recipientes de reacción de modo que más de 20% pero menos de 95% de los recipientes de reacción contengan al menos una molécula, donde el analito está ligado a una nanopartícula o micropartícula mediante un componente de captura;
 - (b) determinar la presencia o ausencia del analito en cada recipiente de reacción para identificar el número de recipientes de reacción que contienen analito y/o para identificar el número de recipientes de reacción que no contienen analito; y
 - (c) determinar la concentración del analito en la muestra de fluido mediante un análisis de distribución gaussiana del número de recipientes de reacción que contienen el analito.
2. El método según la reivindicación 1, en el que, en la etapa (a), más de 20% pero menos de 60% de los recipientes de reacción contienen al menos una molécula.
3. El método según la reivindicación 1, en el que, en la etapa (a), más de 60% pero menos de 95% de los recipientes de reacción contienen al menos una molécula.
4. El método según la reivindicación 1, en el que, en la etapa (a), la muestra que se va a probar se distribuye en al menos 1.000 recipientes de reacción.
5. El método según la reivindicación 1, en el que, en la etapa (a), la muestra que se va a probar se distribuye en de 10.000 a 200.000 recipientes de reacción.
6. El método según la reivindicación 5, en el que la muestra que se va a probar se distribuye en de 50.000 a 100.000 recipientes de reacción.
7. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el analito es una biomolécula.
8. El método según la reivindicación 7, en el que la biomolécula se selecciona del grupo que consiste en una proteína, un ácido nucleico, un lípido y un carbohidrato.
9. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que los recipientes de reacción tienen un volumen de 10 attolitros a 50 picolitros.
10. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que al menos una porción del recipiente de reacción está definida por un extremo distal de una fibra óptica.



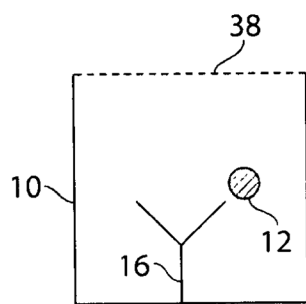


Fig. 1E

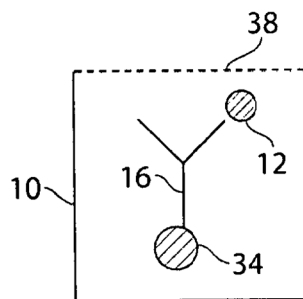


Fig. 1F

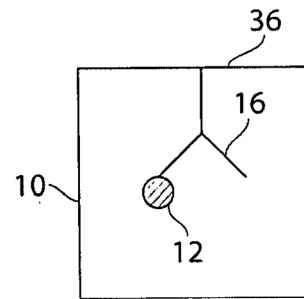


Fig. 1G

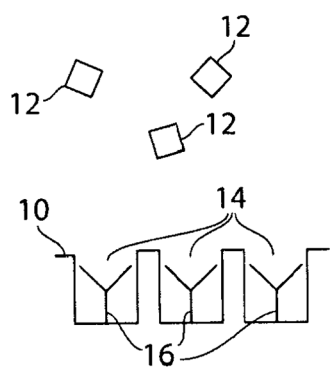


Fig. 2A

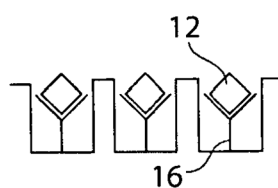


Fig. 2B

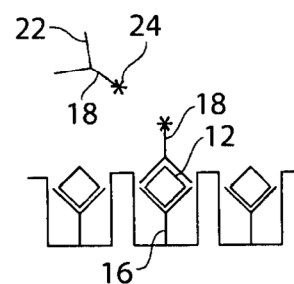


Fig. 2C

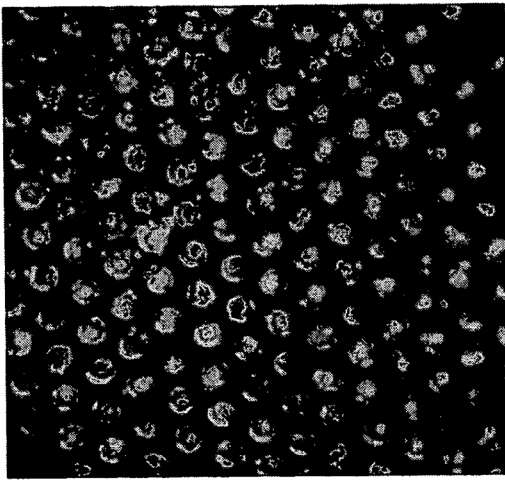


Fig. 3A

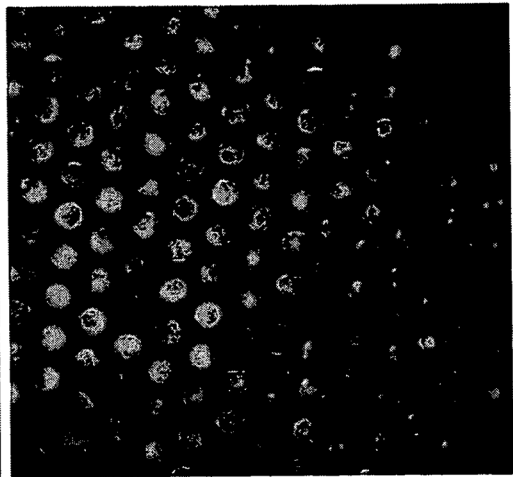


Fig. 3B

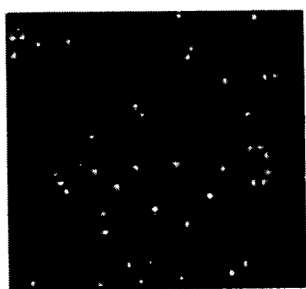


Fig. 4A

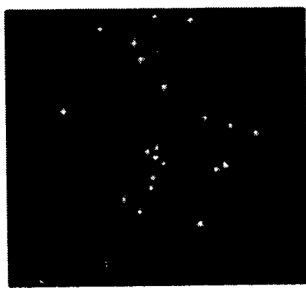


Fig. 4B

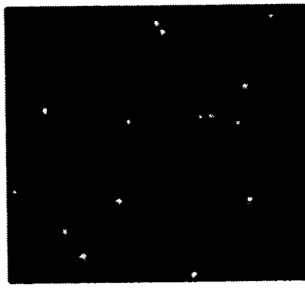


Fig. 4C

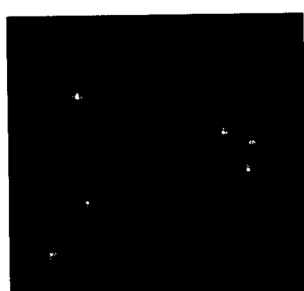


Fig. 4D

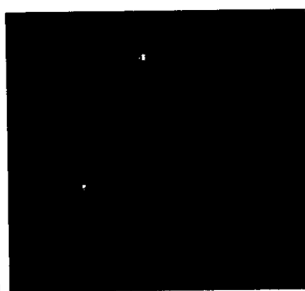


Fig. 4E

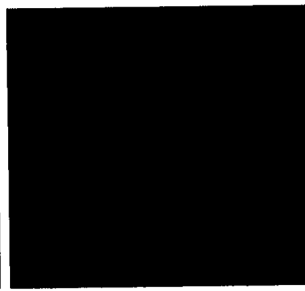


Fig. 4F

LECTURA DIGITAL DE LA DIANA

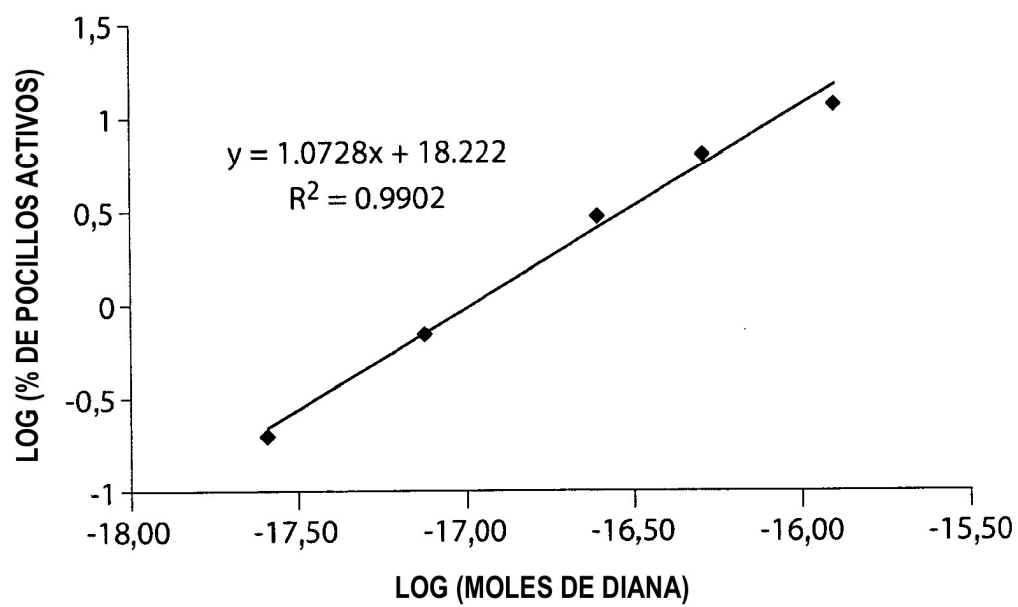


Fig. 5

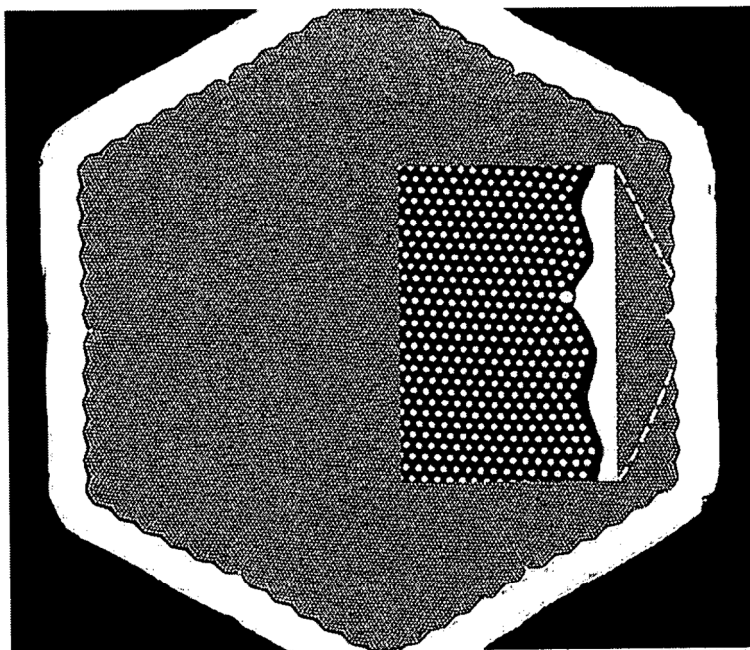


Fig. 6A

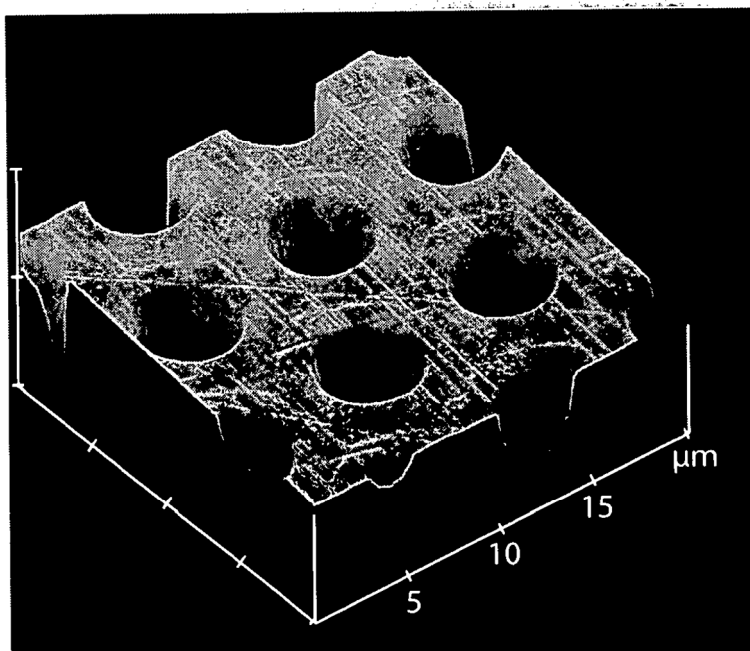


Fig. 6B

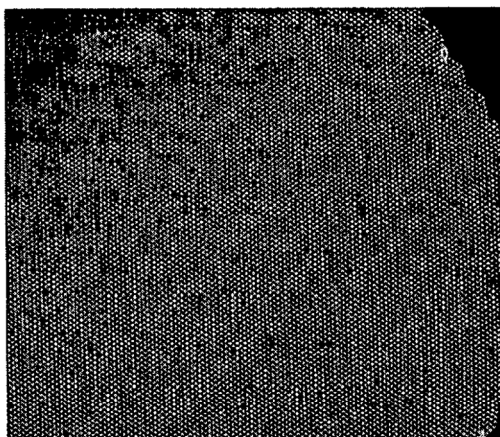


Fig. 7A

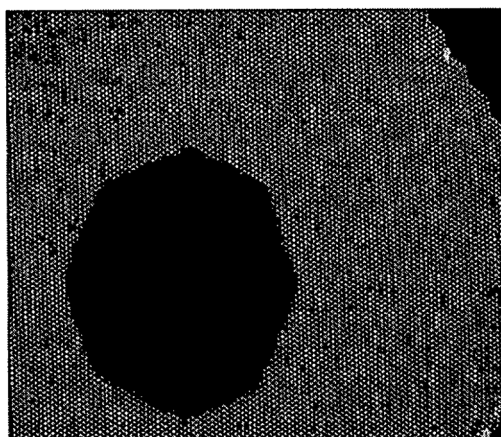


Fig. 7B

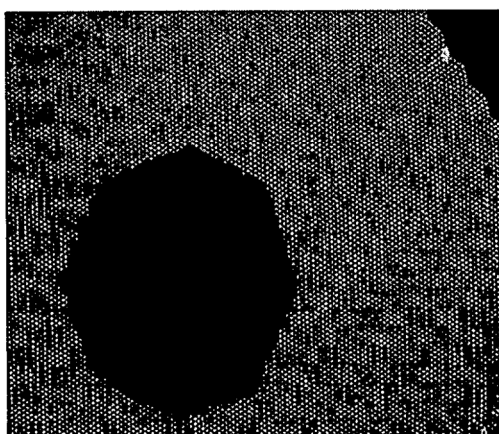


Fig. 7C

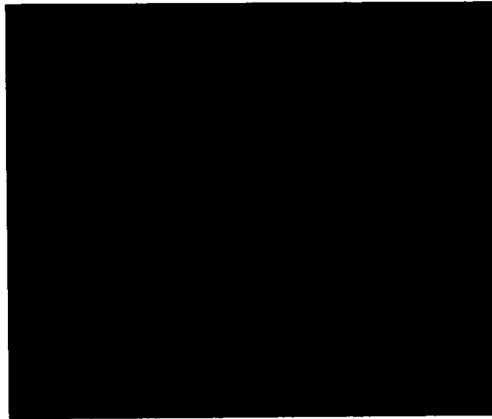


Fig. 8A

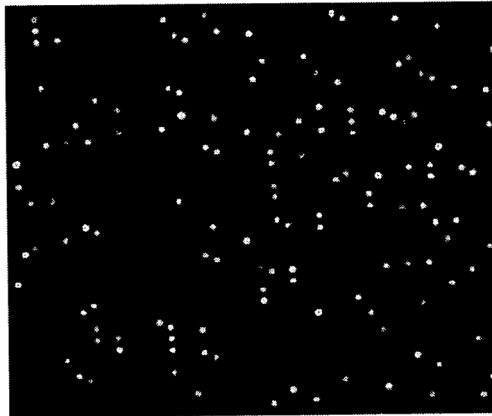


Fig. 8B

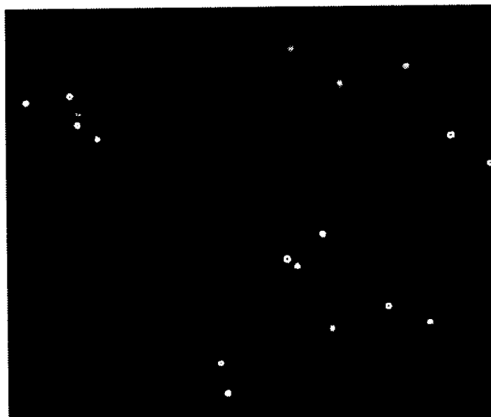


Fig. 8C

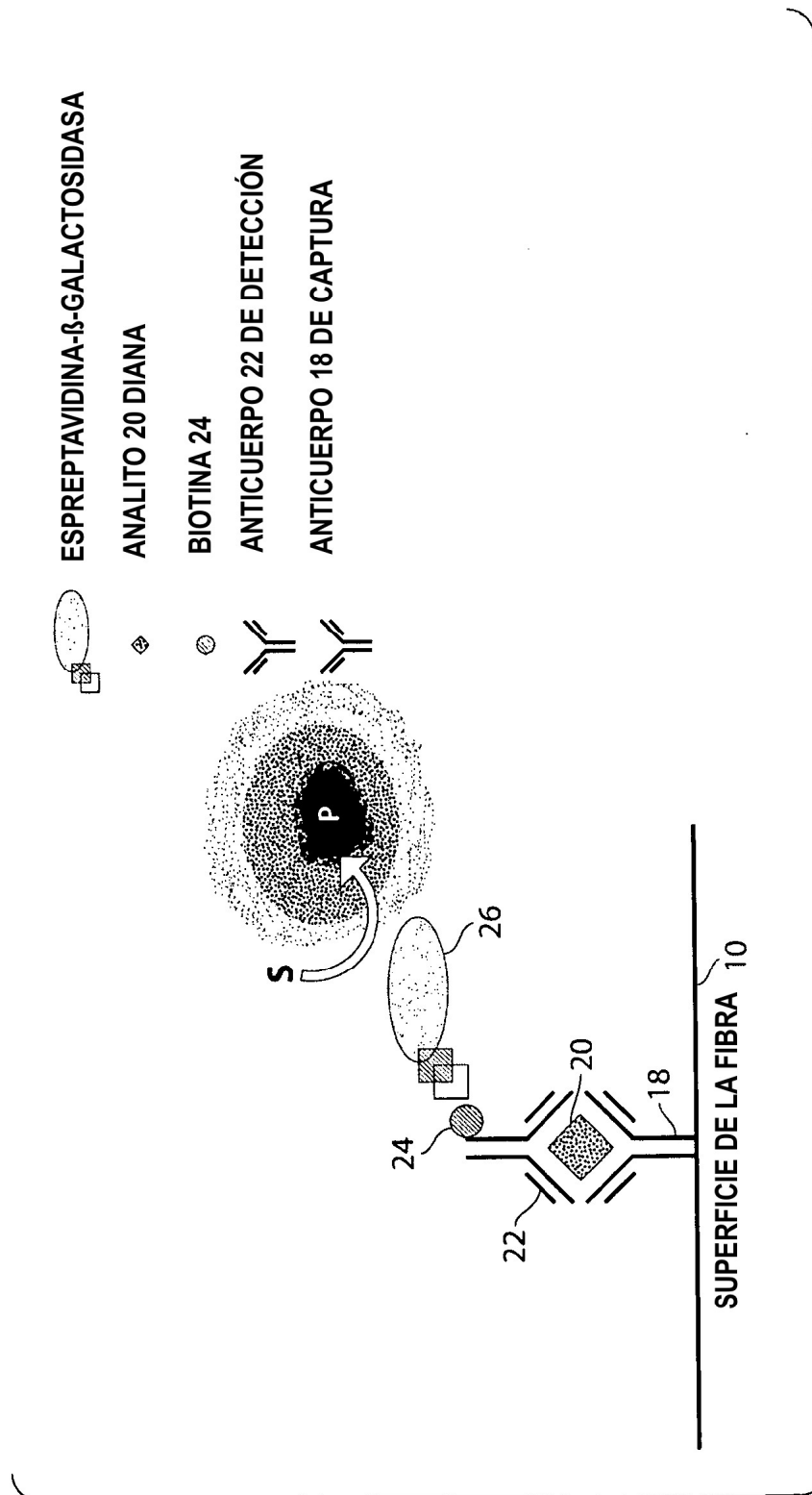


Fig. 9

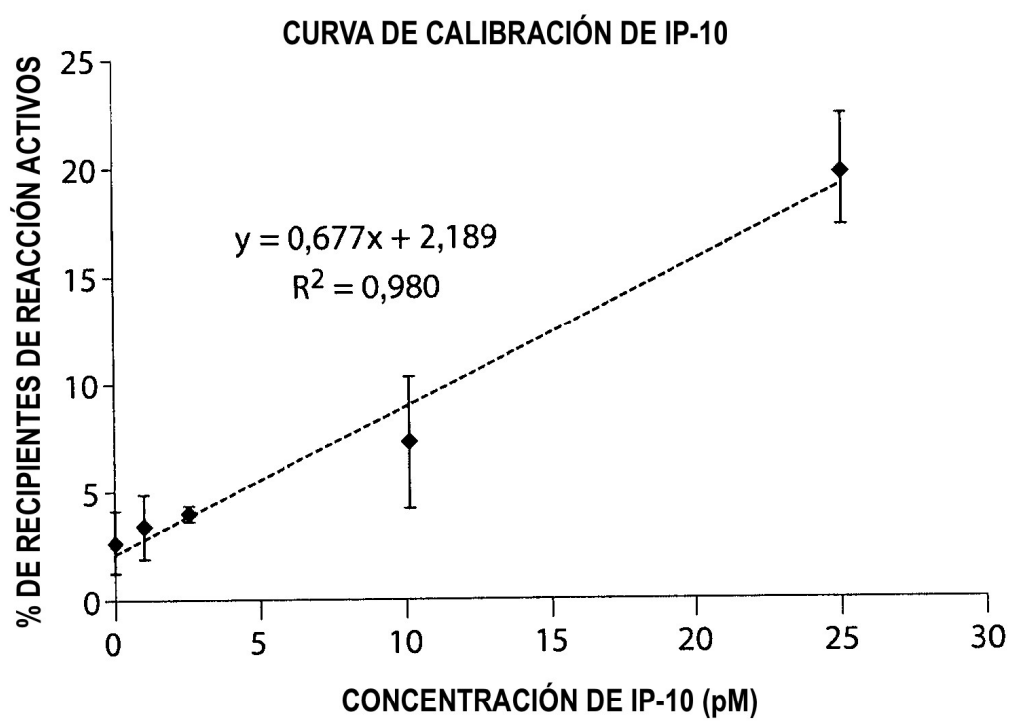


Fig. 10