

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 613 083**

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: **20.02.2007 E 12177276 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.11.2016 EP 2538220**

54 Título: **Métodos y matrices para detección de analito objeto de estudio y determinación de concentración de analito objeto de estudio en disolución**

30 Prioridad:

21.02.2006 US 775692 P

17.04.2006 US 792736 P

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

22.05.2017

73 Titular/es:

**TRUSTEES OF TUFTS COLLEGE (100.0%)
Tufts University, 4th Floor, Ballou Hall
Medford, MA 02155, US**

72 Inventor/es:

**WALT, DAVID R.;
RISSIN, DAVID M. y
GORRIS, HANS-HEINER**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 613 083 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 y matrices para detección de analito objeto de estudio y determinación de concentración de analito objeto de estudio en disolución.

Derechos del gobierno

- 5 El gobierno de los Estados Unidos puede tener ciertos derechos en esta invención conforme al Contrato N° N00014-01-1 adjudicado por la Oficina de la Agencia de Proyectos de Investigación Avanzados de Defensa (DARPA, por sus siglas en inglés) de Investigación Naval, del Departamento de Defensa.

Antecedentes

10 Los métodos que implantan detección de alta sensibilidad y bajo nivel de analito junto con protocolos experimentales rápidos y reproducibles son la piedra angular de las mediciones analíticas modernas. En la actualidad, la mayoría de las técnicas conocidas para cuantificar niveles bajos de analito objeto de estudio en una matriz de muestra usa procedimientos de amplificación para aumentar el número de moléculas informadoras y proporcionar de ese modo una señal medible. Estos procedimientos conocidos incluyen inmunoanálisis ligados a enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés) para amplificar la señal en ensayos basados en anticuerpos, así como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) para multiplicar cadenas de ADN objeto de estudio en ensayos basados en ADN. Una técnica de amplificación de objeto de estudio de proteínas más sensible pero indirecta, denominada inmuno-PCR (véase Sano, T.; Smith, C. L.; Cantor, C. R. *Science* 1.992, 258, 120-122), hace uso de marcadores de oligonucleótidos, que se pueden amplificar con posterioridad usando PCR y detectar usando un ensayo de ADN (véase Nam, J. M.; Thaxton, C. S.; Mirkin, C. A. *Science* 2.003, 301, 1.884-1.886; Niemeyer, C. M.; Adler, M.; Pignataro, B.; Lenhert, S.; Gao, S.; Chi, L. F.; Fuchs, H.; Blohm, D. *Nucleic Acids Research* 1.999, 27, 4.553-4.561; y Zhou, H.; Fisher, R. J.; Papas, T. S. *Nucleic Acids Research* 1.993, 21, 6.038-6.039). Mientras el método inmuno-PCR permite detección de proteínas de nivel ultra bajo, es un procedimiento de ensayo complejo y puede tener tendencia a generación de señales de falsos positivos (véase Niemeyer, C. M.; Adler, M.; Wacker, R. *Trends in Biotechnology* 2.005, 23, 208-216).

- 25 Una desventaja de estos métodos conocidos es su dependencia de etapas separadas para multiplicar moléculas informadoras para proporcionar una señal medible, requiriendo de ese modo etapas de multiplicación adicionales y así tiempo, equipo y materiales adicionales.

Además, los métodos conocidos para cuantificar con precisión la concentración de un analito particular en disolución se basan todos en respuestas conjuntas en que muchas moléculas de analito dan lugar a la señal medida.

- 30 Por lo tanto, hay una necesidad en la técnica de un método mejorado y sistema de detección de analito objeto de estudio.

Breve Sumario de la invención

La presente invención, como está definida por las reivindicaciones, es un método para detectar y cuantificar un analito objeto de estudio que es una biomolécula en una muestra, comprendiendo el método:

- 35 a) proporcionar una muestra y un sustrato, donde dicha muestra comprende un analito objeto de estudio que es una biomolécula, conteniendo dicho sustrato al menos 1.000 recipientes de reacción, teniendo cada recipiente de reacción un volumen definido de entre 10 attolitros y 50 picolitros;
- 40 b) poner en contacto el sustrato con la muestra de manera que los recipientes de reacción contengan el analito objeto de estudio que es una biomolécula ligado a los componentes de captura de manera que la relación de analito objeto de estudio que es una biomolécula para el número de recipientes de reacción es menor que 1:1; y
- c) determinar la fracción de los recipientes de reacción que contiene una biomolécula única.

La presente descripción explica en líneas generales métodos, sistemas y dispositivos ejemplares que se pueden usar para realizar el método de la invención.

- 45 Según una realización, la presente descripción se refiere a un método para detectar un analito objeto de estudio en una muestra. El método incluye proporcionar una matriz que comprende una pluralidad de sitios, comprendiendo cada sitio un componente de captura y poner en contacto la matriz con la muestra de manera que cada sitio en un subconjunto de la pluralidad de sitios contenga un analito objeto de estudio único. Cada analito objeto de estudio comprende un componente enzimático. El método incluye además poner en contacto la matriz con un sustrato enzimático y detectar un cambio en una propiedad óptica en cada uno de los sitios como una indicación de la presencia del analito objeto de estudio.
- 50

- La presente descripción, en otra realización, se refiere a un método para detectar analitos objeto de estudio en una muestra. El método incluye proporcionar una matriz que comprende una pluralidad de sitios y poner en contacto la matriz con la muestra de manera que cada sitio en un primer subconjunto de la pluralidad de sitios contenga un único primer analito objeto de estudio y cada sitio en un segundo subconjunto de la pluralidad de sitios contenga un
- 55

único segundo analito objeto de estudio. En esta realización, cada sitio comprende un componente de captura y cada uno de los analitos objeto de estudio, primero y segundo, comprende un componente enzimático. El método incluye además poner en contacto la matriz con un primer sustrato enzimático y detectar cualquier cambio en una propiedad óptica como resultado del primer sustrato enzimático en cada uno de los sitios como una indicación de la presencia de uno de los analitos objeto de estudio, primero o segundo. Además, el método incluye lavar la matriz y poner en contacto la matriz con un segundo sustrato enzimático. Además, el método incluye detectar cualquier cambio en una propiedad óptica como resultado del segundo sustrato enzimático en cada uno de los sitios como una indicación de la presencia de uno de los analitos objeto de estudio, primero o segundo.

Según otra descripción, la presente invención se refiere a un método para detectar un analito objeto de estudio en una muestra. El método incluye proporcionar una matriz que comprende una pluralidad de sitios y poner en contacto la matriz con la muestra de manera que cada sitio en un subconjunto de la pluralidad de sitios contenga un único analito objeto de estudio. En este método, cada sitio comprende un componente de captura. El método también incluye poner en contacto cada uno de los analitos objeto de estudio únicos con un ligando de unión que comprende un componente enzimático y poner en contacto además la matriz con un sustrato enzimático. Además, el método incluye detectar un cambio en una propiedad óptica en cada uno de los sitios como una indicación de la presencia del analito objeto de estudio.

La presente descripción, según otra realización, es un método para cuantificar una cantidad de un analito objeto de estudio en una muestra. El método incluye proporcionar una matriz que comprende una pluralidad de sitios, comprendiendo cada sitio un componente de captura y poner en contacto la matriz con la muestra de manera que cada sitio en un subconjunto de la pluralidad de sitios contenga un único analito objeto de estudio. En esta realización, cada analito objeto de estudio comprende un componente enzimático. El método también incluye poner en contacto la matriz con un sustrato enzimático, detectar un cambio en una propiedad óptica en cada uno de los sitios como una indicación de la presencia del analito objeto de estudio y calcular una cantidad del analito objeto de estudio en la muestra.

En una realización, la presente descripción considera un método para producir una matriz de moléculas únicas, que comprende: proporcionar una muestra y una matriz, comprendiendo dicha muestra moléculas de analito objeto de estudio en una concentración, comprendiendo dicha matriz al menos 1.000 sitios, teniendo cada sitio un volumen definido entre 10 attolitros y 50 picolitros y poner en contacto dicha matriz con dicha muestra de manera que la relación de moléculas de analito objeto de estudio para cada sitio de dicha matriz sea menor que 1:1, a fin de producir una matriz que comprenda sitios que contengan moléculas únicas. En una realización, la presente descripción considera la matriz, como una composición de materia, producida según este método. No se desea que la presente descripción esté limitada por la naturaleza del analito objeto de estudio. En una realización según la invención, dicho analito objeto de estudio comprende biomoléculas (por ejemplo, proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y carbohidratos; alternativamente, hormonas, citocinas y antígenos celulares; preferiblemente, receptores tales como receptores neuronales, receptores hormonales y receptores de nutrientes). No se pretende que la presente invención esté limitada por la naturaleza de la biomolécula. En una realización, dicha biomolécula se selecciona del grupo que consiste en: proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y carbohidratos. En otra realización, dicha biomolécula se selecciona del grupo que consiste en: hormonas, citocinas y antígenos celulares. En otra realización más, dicha biomolécula es un receptor (por ejemplo, receptores neuronales, receptores hormonales y receptores de nutrientes). Sujeta a cualquier restricción definida según las reivindicaciones, no se desea que la presente invención esté limitada por la relación. En una realización, la relación se elige de manera que se consigan sitios con moléculas únicas. En una realización preferida, la relación se elige de manera que la lectura sea una lectura digital (por ejemplo, cada sitio tenga una molécula o ninguna). En una realización, la relación es menor que 1:5. En otra realización, dicha relación es 1:10. En otra realización más, dicha relación está entre 1:5 y 1:500. En una realización, el porcentaje de sitios que contiene una sola molécula proporciona una medida de la concentración de moléculas en dicha muestra (en otras palabras, contando y conociendo el número de sitios totales y el volumen definido de los sitios).

En una realización, el método comprende además, después de la etapa b), sellar la matriz de manera que los contenidos de cada sitio no puedan escapar de dicho sitio. En una realización, la presente invención considera el sellado de moléculas en disolución, la captura de moléculas en disolución (por ejemplo, con un componente de captura) antes del sellado y/o la captura de moléculas de la disolución (y en algunas realizaciones, la eliminación de moléculas de la disolución) antes de sellado. En una realización, la presente invención considera la matriz sellada, producida según el método.

No se desea que la presente invención esté limitada por la naturaleza del componente de captura. En una realización, en la que cada sitio de dicha matriz comprende un componente de captura. En otra realización, dicho analito objeto de estudio comprende un ácido nucleico de una sola cadena y dicho componente de captura comprende un ácido nucleico complementario.

Sujeta a cualquier restricción definida según las reivindicaciones, no se desea que la presente invención esté limitada por ningún volumen particular. Sin embargo, en una realización, dicho volumen definido se mide en femtolitros. En una realización, la presente descripción considera, como una composición de materia, una matriz de sitios, dichos sitios de volumen de femtolitro definido, dicho volumen definido es el mismo en cada sitio y oscila desde aproximadamente 30 femtolitros a aproximadamente 60 femtolitros. En una realización, dicho volumen de

femtolitros definido es 46 femtolitros.

Sujeta a cualquier restricción definida según las reivindicaciones, no se desea que la presente invención esté limitada al número de sitios. Mientras se pueden usar 1.000 sitios, preferiblemente se emplean más sitios (por ejemplo, más de 10.000, entre 20.000 y 30.000 sitios e incluso más preferiblemente entre 100.000 y 10.000.000 de sitios.

En otra realización, la presente invención considera un método para detectar un analito objeto de estudio que es una biomolécula en una muestra, comprendiendo el método: proporcionar una muestra y una matriz, comprendiendo dicha muestra un analito objeto de estudio biomolécula, comprendiendo dicha matriz al menos 1.000 sitios, teniendo cada sitio un volumen definido entre 10 attolitros y 50 picolitros; poner en contacto dicha matriz con dicha muestra de manera que la relación de analito objeto de estudio biomolécula en cada sitio de cada matriz sea menor que 1:1 y determinar el número de sitios de dicha matriz que contienen un único analito objeto de estudio que es una biomolécula. De nuevo, no se desea que la presente invención esté limitada por la relación. En una realización, la relación se elige de manera que se consigan sitios con moléculas únicas. En una realización preferida, la relación se elige de manera que la lectura sea una lectura digital (por ejemplo, cada sitio tendrá una molécula o ninguna). En una realización, la relación es menor que 1:5. En otra realización, dicha relación es 1: 10. En otra realización más, dicha relación es entre 1:5 y 1:500. En una realización, el porcentaje de sitios que contienen una sola molécula proporciona una medida de la concentración de moléculas en dicha muestra (en otras palabras, contando y conociendo el número de sitios totales y el volumen definido de los sitios).

Preferiblemente, se etiquetan las biomoléculas (por ejemplo, con un fluoróforo). En una realización, dicha determinación comprende detectar un cambio en una propiedad óptica en dichos sitios como una indicación de la presencia de dicho analito objeto de estudio. De nuevo, se prefiere que el porcentaje de sitios que contenga una biomolécula única proporcione una medida de la concentración de biomoléculas en dicha muestra.

En una realización, el método comprende además, después de la etapa de puesta en contacto pero antes de la etapa de determinación, sellar la matriz de manera que los contenidos de cada sitio no puedan escapar de dicho sitio. En una realización, la presente invención considera el sellado de moléculas en disolución, la captura de moléculas en disolución (por ejemplo, como un componente de captura) antes de sellado y/o la captura de moléculas de la disolución (y en algunas realizaciones, la eliminación de moléculas de la disolución) antes de sellado. En una realización, la presente invención considera la matriz sellada, producida según el método.

En otra realización más, y dentro del alcance definido por las reivindicaciones, la presente invención considera un método para detectar un analito objeto de estudio en una muestra, comprendiendo el método: proporcionar una muestra y una matriz, comprendiendo dicha muestra un analito objeto de estudio biomolécula en una primera concentración, comprendiendo dicha matriz al menos 10.000 sitios, teniendo cada sitio un volumen de femtolitros definido; diluir dicha muestra para crear una muestra diluida, comprendiendo dicha muestra diluida un analito objeto de estudio biomolécula en una segunda concentración: poner en contacto dicha matriz con dicha muestra diluida de manera que la relación de analito objeto de estudio biomolécula en cada sitio de dicha matriz sea entre 1: 5 y 1: 500 y determinar el número de sitios de dicha matriz que contienen una biomolécula única.

En otra realización más, la presente descripción considera un método para producir una matriz de células únicas, comprendiendo el método: proporcionar una muestra y una matriz, comprendiendo dicha muestra células, comprendiendo dicha matriz al menos 1.000 sitios, teniendo cada sitio un volumen definido entre 10 attolitros y 50 picolitros y poner en contacto dicha matriz con dicha muestra de manera que la relación de células en cada sitio de dicha matriz sea menor que 1: 1, a fin de producir una matriz que comprenda sitios que contengan moléculas únicas. En una realización, la presente descripción considera, como una composición de materia, la matriz producida según esta realización del método. En una realización del método, la presente descripción considera además la etapa de determinar qué sitios de la matriz contienen células únicas. Preferiblemente, el porcentaje de sitios que contienen una célula única proporciona una medida de la concentración de células en dicha muestra. No se desea que la presente descripción esté limitada por la naturaleza de las células. Se consideran células procariotas (por ejemplo, células bacterianas) así como células eucariotas (por ejemplo, células de mamífero tales como células tumorales y células nerviosas. Aunque no es necesario comprender el mecanismo de una descripción, se cree que una matriz de células únicas permite la captura de un ARNm objeto de estudio único por pozo. En una realización, las células únicas son atrapadas y lisadas con posterioridad. En una realización, un pozo único comprende una sola célula. En una realización, se lisa la célula única del pozo único. En una realización, los objetos de estudio de la célula única son atrapados dentro del pozo único. En otra realización, se lisa una célula única y los ARNm objetos de estudio se capturan con posterioridad. Por ejemplo, se lisa una célula única en la que una pluralidad de ARNm objetos de estudio son capturados en pozos con no más de una copia de cada tipo de transcripción por pozo. Aunque no es necesario comprender el mecanismo de una invención, se cree que aunque una célula puede comprender cientos de diferentes transcripciones con muchas copias de cada una por célula, la presente invención considera capturar no más de uno de cada diferente tipo de transcripción por pozo (es decir, por ejemplo, cada pozo comprende no más de una copia de cada transcripción). En una realización, la célula única comprende múltiples objetos de estudio (es decir, por ejemplo, tipos de ARNm). En una realización, los múltiples objetos de estudio (es decir, por ejemplo, tipos de ARNm) son interrogados de manera secuencial determinándose de ese modo su presencia (es decir, por ejemplo, usando diferentes fluoróforos coloreados). En una realización, los objetos de estudio (es decir, por ejemplo,

tipos de ARNm) se determinan de manera cuantitativa por detección de una señal digital.

5 En otra realización más, la presente descripción considera un método para producir una matriz que comprende una pluralidad de diferentes células, comprendiendo el método: proporcionar una muestra y una matriz, comprendiendo dicha muestra células, comprendiendo dicha matriz al menos 1.000 sitios, teniendo cada sitio un volumen definido entre 10 attolitros y 50 picolitros y poner en contacto dicha matriz con dicha muestra. En una realización, la pluralidad de diferentes células se lisa, formándose de ese modo un lisado que comprende objetos de estudio múltiples. En una realización, cada una de la pluralidad de diferentes células se lisa dentro de diferentes pozos. En una realización, la pluralidad de diferentes células se lisa dentro de un único pozo. En una realización, se mezclan los lisados de la pluralidad de diferentes células. En una realización, se capturan los lisados mezclados. En una realización, los múltiples objetos de estudio (es decir, por ejemplo, tipos de ARNm) se interrogan de manera secuencial determinándose de ese modo su presencia (es decir, por ejemplo, usando diferentes fluoróforos coloreados). En una realización, los objetos de estudio (es decir, por ejemplo, tipos de ARNm) se determinan cuantitativamente detectando una señal digital.

15 En una realización, el método comprende además, poner en contacto después la matriz con las células, sellando la matriz de manera que los contenidos de cada sitio no pueden escapar de dicho sitio. En una realización, la presente descripción considera el sellado de las células en disolución, la captura de células en disolución (por ejemplo, con un componente de captura) antes de sellado y/o la captura de células de la disolución (y en algunas realizaciones, la eliminación de células de la disolución) antes de sellado. En una realización, la presente descripción considera la matriz sellada comprendiendo células, producidas según el método descrito anteriormente. En una realización, las células se inmovilizan mediante dicho componente de captura (por ejemplo, un receptor, anticuerpo o proteína, tal como fibronectina) después de poner en contacto dicha matriz (por ejemplo, está presente el componente de captura y preferiblemente unido, a cada sitio de la matriz).

25 De nuevo, no se desea que la presente descripción esté limitada por la relación de células a sitios. En una realización, la relación se elige de manera que se consigan sitios con células únicas. En una realización preferida, la relación se elige de manera que la lectura sea una lectura digital (por ejemplo, cada sitio tendrá una célula o ninguna). En una realización, la relación es menor que 1: 5. En otra realización, dicha relación es 1: 10. En otra realización más, dicha relación está entre 1: 5 y 1: 500. En una realización, el porcentaje de sitios que contienen una única célula proporciona una medida de la concentración de moléculas en dicha muestra (en otras palabras, contando y conociendo el número de sitios totales y el volumen definido de los sitios).

30 En una realización, la presente invención considera un método para detectar células en una muestra, comprendiendo el método: proporcionar una muestra y una matriz, comprendiendo dicha muestra células en una primera concentración, comprendiendo dicha matriz al menos 1.000 sitios, teniendo cada sitio un volumen definido entre 10 attolitros y 50 picolitros; diluir dicha muestra para crear una muestra diluida, comprendiendo dicha muestra diluida células en una segunda concentración; poner en contacto dicha matriz con dicha muestra diluida de manera que la relación de células para cada sitio de dicha matriz sea menor que 1: 1 y determinar el número de sitios de dicha matriz que contienen una sola célula. Esta matriz se sella preferiblemente previamente a dicha etapa de determinación y la presente invención considera tanto la matriz como la matriz sellada como composiciones de materia.

40 En otra realización más, la presente invención considera un método para detectar un analito objeto de estudio de una célula en una muestra, comprendiendo el método: proporcionar una muestra y una matriz, comprendiendo dicha muestra células en una primera concentración, comprendiendo cada célula un analito objeto de estudio, comprendiendo dicha matriz al menos 1.000 sitios, teniendo cada sitio un volumen de femtolitro definido; diluir dicha muestra para crear una muestra diluida, comprendiendo dicha muestra diluida células en una segunda concentración; poner en contacto dicha matriz con dicha muestra diluida de manera que la relación de células para cada sitio de dicha matriz sea menor que 1: 1; tratar dichas células en dicha matriz en condiciones de manera que se lisen dichas células y determinar el número de sitios de dicha matriz que contienen un analito objeto de estudio de dichas células. Esta matriz se sella preferiblemente previamente a dicha etapa de determinación y la presente invención considera, como una composición de la materia, la matriz y la matriz sellada producida de este modo.

50 En una realización alternativa, la presente invención considera un método para detectar un analito objeto de estudio de una célula en una muestra, comprendiendo el método: proporcionar una muestra y una matriz, comprendiendo dicha muestra células en una concentración, comprendiendo dicha matriz al menos 1.000 sitios, teniendo cada sitio un volumen de femtolitros definido; tratar dichas células en condiciones tales que dichas células se lisen a fin de crear una muestra tratada; poner en contacto dicha matriz con dicha muestra tratada de manera que la relación del analito objeto de estudio para cada sitio de dicha matriz sea menor que 1: 1 y determinar el número de sitios de dicha matriz que contienen un analito objeto de estudio. De nuevo, la matriz se sella preferiblemente previamente a dicha etapa de determinación y la presente invención considera, como una composición de la materia, la matriz y la matriz sellada producida de esta manera.

60 En una realización, las células son células procariotas. En una realización particular, las células son células bacterianas y el analito objeto de estudio es una enzima bacteriana liberada de las células después de lisis. En una realización preferida, cada sitio contiene un reactivo de captura dirigido a capturar el analito objeto de estudio

después de lisis.

Un método para detectar un componente de reacción que afecta a una reacción, comprendiendo el método: proporcionar un componente de la reacción, una muestra y una matriz, comprendiendo dicha muestra un analito objeto de estudio en una primera concentración, comprendiendo dicha matriz al menos 1.000 sitios, teniendo cada sitio un volumen definido entre 10 attolitros y 50 picolitros; poner en contacto dicha matriz con dicha muestra de manera que la relación del analito objeto de estudio para cada sitio de dicha matriz sea menor que 1: 1; introducir dicho componente de reacción para cada sitio de dicha matriz y determinar si el componente de la reacción afecta a una reacción. En una realización preferida, dicho analito objeto de estudio es una enzima y hay sustrato para dicha enzima en cada sitio de dicha matriz previamente a la etapa de determinación. En una realización preferida en particular, dicho componente de reacción es un inhibidor de enzimas y dicha etapa de determinación comprende determinar si dicho inhibidor de enzimas inhibe la reacción de dicha enzima con dicho sustrato. En una realización, la presente invención considera sellar la matriz previamente a la etapa de determinación y se considera tanto la matriz como la matriz sellada como composiciones de la materia.

Ciertamente, la presente invención considera específicamente realizaciones en que las constantes de velocidad de enzima se miden en ajustes únicos enzima - molécula. Por ejemplo, en la realización, la enzima y el inhibidor se preincuban previamente a la introducción en los sitios de la matriz (por ejemplo, en un sistema tampón acuoso) junto en masa, de manera que la concentración de inhibidor sea mayor que la constante de disociación para unión de inhibidor (K_i) y probablemente todos los sitios activos de la enzima se bloquean o se ocupan. Como K_i difiere para diferentes pares enzima/inhibidor, la concentración de inhibidor debe ajustarse de acuerdo con eso. Con algunos pares enzima/ inhibidor particulares ejemplificados en la presente memoria, se puede emplear una variedad de concentraciones de partida de inhibidor, oscilando entre 100 mM y 20 μ M. En una segunda etapa de esta realización del método, se añade uno o más sustratos (por ejemplo, un sustrato cromogénico) en un sistema tampón acuoso, preferiblemente en un exceso en volumen alto (entre 10 veces y 10.000 veces). En una tercera etapa de esta realización del método, se añade la disolución volumétrica de la matriz de sitios, teniendo cada sitio un volumen definido (entre 10 attolitros y 50 picolitros, más preferiblemente femtolitros). En este punto, el inhibidor no está en exceso más; por supuesto, la concentración del inhibidor es mucho menor que la K_i (se prefiere que menor que 100.000 moléculas de inhibidor y preferiblemente menor que 10.000 moléculas de inhibidor e incluso más preferiblemente menor que 3.000 moléculas de inhibidor e incluso más preferiblemente menor que 1.000 moléculas de inhibidor, quedan en la disolución). En el punto en el que se añade la solución a los sitios de la matriz, se prefiere que la concentración enzimática sea tal (debido a los muchos factores de dilución de la etapa 2) que haya únicamente una enzima única en cada sitio de la matriz (o, más típicamente, una enzima única en algunos sitios y sin enzima en otros). En una realización preferida, la matriz se controla después por la señal en el tiempo con un medio de detección (por ejemplo, para que se pueda detectar la utilización de sustrato por la enzima). Cuando se representa gráficamente la distribución de la frecuencia de tiempos de comienzo de recambio del sustrato, se puede calcular la constante de velocidad $K_{apagado}$.

En otra realización de dicho método, la concentración del inhibidor se elige de manera que esté en el mismo intervalo que K_i . En esta concentración de inhibidor la enzima ligada a inhibidor está en equilibrio con la enzima sin inhibidor. La disolución volumétrica se añade a la matriz de sitios, teniendo cada sitio un volumen definido (entre 10 attolitros y 50 picolitros, más preferiblemente femtolitros). De nuevo, se prefiere que la concentración enzimática se elija para dar lugar únicamente a una enzima única en cada sitio de la matriz (o, más típicamente, una enzima única en algunos sitios y sin enzima en otros sitios). Cuando la señal (por ejemplo, fluorescencia) se controla en el tiempo, se puede observar unión, liberación y posterior unión en cada sitio cuando hay enzima en la matriz.

En otra realización más, la presente invención considera un método para detectar un componente de reacción que afecte a una reacción, comprendiendo el método: proporcionar un componente de reacción, una muestra y una matriz, comprendiendo dicha muestra un analito objeto de estudio biomolécula en una primera concentración, comprendiendo dicha matriz al menos 1.000 sitios, teniendo cada sitio un volumen definido entre 10 attolitros y 50 picolitros; diluir dicha muestra para crear una muestra diluida, comprendiendo dicha muestra diluida un analito objeto de estudio biomolécula en una segunda concentración; poner en contacto dicha matriz con dicha muestra diluida de manera que la relación de analito objeto de estudio biomolécula para cada sitio de dicha matriz sea menor que 1: 1; introducir dicho componente de reacción a cada sitio de dicha matriz y determinar si el componente de reacción afecta a una reacción.

En otra realización más, la presente invención considera un método para detectar inhibición de enzima, comprendiendo el método: proporcionar i) un componente de reacción, ii) una muestra, comprendiendo dicha muestra un analito objeto de estudio enzimático en una primera concentración, iii) un sustrato para dicho analito objeto de estudio enzimático y iv) una matriz, comprendiendo dicha matriz al menos 10.000 sitios, teniendo cada sitio un volumen de femtolitros definido; diluir dicha muestra para crear una muestra diluida, comprendiendo dicha muestra diluida un analito objeto de estudio enzimático en una segunda concentración; poner en contacto dicha matriz, en cualquier orden, con dicho sustrato, dicho componente de reacción y dicha muestra diluida de manera que la relación de analito objeto de estudio enzimático a cada sitio de dicha matriz sea entre 1: 5 y 1: 500 y determinar si el componente de la reacción inhibe la reacción de dicha enzima con dicho sustrato.

En una realización, se utilizan nanopartículas para la lectura digital de objeto de estudio y concentraciones. Las

- nanopartículas presentan diversas ventajas sobre una lectura digital de enzimas. Con una propuesta de enzimas, a medida que aumentan las concentraciones, la linealidad de la lectura digital, que sigue a la distribución de Poisson, se pierde. Usando nanopartículas funcionalizadas con especies fluorescentes, la presente invención considera en una realización poder realizar una lectura digital así como la lectura de intensidad volumétrica tradicional, que se usa de manera extensa en nuestro laboratorio. Como la linealidad de la señal digital se pierde, el análisis se puede desplazar de una lectura digital a una lectura de intensidad tradicional usando las nanopartículas. Se puede leer después la señal como una intensidad promedio de cada sitio en la matriz (por ejemplo, intensidad del pozo promedio) que se relaciona con concentración y aumentará significativamente el intervalo de concentraciones que se puede leer con este sistema. En algunas realizaciones empleando nanopartículas, no se sella la matriz.
- Se considera una variedad de realizaciones, incluyendo pero no limitándose a realizaciones en que el objeto de estudio se une a la partícula de oro y se introduce en una matriz, comprendiendo dicha matriz una pareja de unión (por ejemplo, ligado inmovilizado). En otra realización, el analito objeto de estudio puede estar unido o inmovilizado de otro modo sobre la matriz y se puede introducir el conjugado de la pareja de unión de la partícula de oro a la matriz para unir el analito objeto de estudio. En otra realización, un primer ligando de unión puede inmovilizar el objeto de estudio y se puede introducir el segundo ligando de unión de la partícula de oro en la matriz para unir el objeto de estudio. En una realización, el objeto de estudio es ácido nucleico y las parejas de unión son sondas complementarias. En otra realización, se considera un formato de sándwich de dos etapas, donde el objeto de estudio puede estar no etiquetado y ser incubado con una primera sonda complementaria; después, se introduce el segundo conjugado de la sonda de nanopartículas en el sitio de la matriz. Se puede considerar que el objeto de estudio opere como un ligador en esta realización.

Breve descripción de los dibujos

- Las FIGS. 1a, 1b y 1c son esquemas transversales de vista lateral que representan modificaciones de haces atacados, según una realización de la presente invención.
- Las FIGS. 2a, 2b y 2c son esquemas transversales de vista lateral que representan un ensayo de sándwich, según una realización de la presente invención.
- Las FIGS. 3a y 3b son fotografías que representan Estreptavidina Alexa Fluor 568® que se une a (a) una matriz de fibra óptica modificada con biotina no refinada y (b) una matriz de fibra óptica modificada con biotina refinada, según una realización de la presente invención.
- Las FIGS. 4a, 4b, 4c, 4d, 4e y 4f son fotografías que representan experimentos según una realización de la presente invención en que β -galactosidasa hidroliza RDG para formar resorufina. Más específicamente, cada una de estas figuras representa una muestra diferente con una concentración diferente de S β G. Las concentraciones fueron: (a) 128 amol, (b) 51 amol, (c) 25 amol, (d) 7,5 amol y (e) 2,6 amol y (f) fue el control.
- La FIG. 5 es un cuadro que representa una representación log-log de los moles de objeto de estudio presente en una muestra con el porcentaje resultante de recipientes de reacción activos, según una realización de la presente invención.
- La FIG. 6a es una fotografía microscópica de una matriz de fibra completa y un primer plano de la inserción del haz, según una realización de la presente invención.
- La FIG. 6b es una imagen AFM de una porción de una superficie atacada, según una realización de la presente invención.
- Las FIGS. 7a, 7b y 7c representan el recinto de los recipientes de reacción y la evaluación del cierre, según una realización. La FIG. 7a es una fotografía microscópica de una disolución de Ru(bpi)₃Cl₂ encerrada en la matriz de cámaras. La FIG. 7b es una fotografía microscópica de una pequeña porción octagonal del haz fotoblanqueado con luz UV. La FIG. 7c es una fotografía microscópica de la FIG. 7b tomada 60 minutos más tarde.
- Las FIGS. 8a, 8b y 8c son fotografías microscópicas que representan la detección de la actividad de únicas moléculas 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 matriz. La FIG. 8b es una fotografía microscópica de una imagen tomada de una porción de un ensayo de enzima a recipiente 1:5. La FIG. 8c es una fotografía microscópica de un ensayo enzima a recipiente 1:80.
- La FIG. 9 es un esquema de una realización para medir constantes de velocidad de enzimas al nivel de enzima única.
- La FIG. 10 es una imagen representativa de una matriz en la que la señal se detecta debido a liberación de inhibidor.
- Las FIGS. 11a, 11b y 11c son trazas de tiempo que muestran recambio de sustrato en presencia de inhibidor o ausencia (11c) de inhibidor.

La FIG. 12 muestra la representación gráfica de mediciones que permiten la determinación de K_{apagado} para un par de enzima/inhibidor particular.

Las FIGS. 13a y 13b muestran una pluralidad de trazas de tiempo (13a) y una traza de tiempo única (13b) representada gráficamente para mostrar señal aumentada con la liberación de inhibidor.

- 5 La FIG. 14 es un histograma de tiempos inactivos, que permiten un cálculo de los valores de vida media para una pareja enzima/inhibidor particular.

La FIG. 15 muestra de manera esquemática una realización en la que se emplea nanopartículas para mejorar la detección.

- 10 La FIG. 16 muestra de manera esquemática una realización alternativa en la que se emplean nanopartículas para mejorar la detección.

La FIG. 17 muestra la detección de nanopartículas de oro en sitios en una matriz.

Descripción detallada

- 15 La presente invención se refiere a métodos para detección y cuantificación enzimática de un analito objeto de estudio o analitos objeto de estudio en una muestra. Más específicamente, la presente invención se refiere a detección y cuantificación enzimática de analitos objeto de estudio usando matrices de recipientes de reacción de tamaño de micrómetro a nanoescala que contienen componentes de captura. Según una realización, se pone en contacto una matriz de recipientes de reacción que contiene componentes de captura con una muestra que contiene al menos un analito objeto de estudio. Después se añade un sustrato cromogénico y el producto cromogénico resultante de la reacción enzimática permite la detección del analito. Además, el porcentaje de recipientes de
20 reacción con analitos objeto de estudio capturados se puede usar para calcular la cantidad de analito objeto de estudio en la muestra usando un método de lectura binario.

- Más específicamente, la presente invención proporciona una matriz de recipientes de reacción de tamaño micrómetro a nanoescala funcionalizados específicamente y capaz de capturar moléculas objeto de estudio que sean enzimas o etiquetadas con enzima. La capacidad para inmovilizar el objeto de estudio permite el uso de etapas
25 de lavado y ensayos indirectos, como se indica en líneas generales a continuación. En el uso, se capturan moléculas de enzima únicas (o etiquetadas con enzimas) en recipientes de reacción individuales y catalizan la producción de un número suficiente de moléculas producto cromogénico para generar una señal detectable. Según una realización que se refiere a las muestras que tienen concentraciones bajas del analito objeto de estudio, sólo una porción de los recipientes de reacción se une a una molécula objeto de estudio, permitiendo de ese modo una lectura binaria de
30 concentración objeto de estudio de la matriz.

Así, la multiplicación enzimática directa en el método y sistema de la presente invención permite la amplificación directa de una señal detectable. Además, a diferencia de los métodos de la técnica anterior, la presente invención permite la detección de bajas concentraciones de proteína.

- 35 El método de cuantificación, según una realización, es un nuevo método para determinación de concentración basado en análisis estadístico. La concentración de enzima de la muestra se determina por distribución de la muestra que contiene enzima y un sustrato adecuado, en muchos recipientes de reacción de nanoescala. En este método, los recipientes contienen cero o una molécula de enzima. Por observación de la presencia o ausencia de un producto fluorescente resultante de catálisis de moléculas de enzima únicas en cada recipiente de reacción, se puede usar un método de lectura binario para contar moléculas de enzima. Finalmente, el porcentaje de recipientes
40 de reacción ocupado por moléculas de enzima está relacionado con la concentración de enzima volumétrica.

I. Matrices

- La presente descripción proporciona composiciones de matrices que comprenden al menos un primer sustrato con una superficie que comprende una pluralidad de localizaciones de la matriz. Por "matriz" en la presente memoria se quiere decir una pluralidad de componentes de captura en un formato de matriz. El tamaño de la matriz dependerá
45 de la composición y el uso final de la matriz. Se pueden preparar matrices que contienen desde aproximadamente 2 componentes de captura diferentes a muchos millones, siendo posibles matrices muy grandes, incluyendo matrices de fibra óptica muy grandes. Generalmente, la matriz comprenderá de dos a tanto como mil millones o más componentes de captura, dependiendo del tamaño de los pozos y el sustrato, así como el uso final de la matriz, así se pueden preparar matrices de densidad muy alta, de densidad alta, de densidad moderada, de densidad baja y de
50 densidad muy baja. Intervalos preferidos para matrices de densidad muy alta son desde aproximadamente 10.000.000 a aproximadamente 2.000.000.000, siendo preferido de aproximadamente 100.000.000 a aproximadamente 1.000.000.000. Matrices de densidad alta oscilan desde aproximadamente 100.000 a aproximadamente 10.000.000, siendo preferido en particular desde aproximadamente 1.000.000 a aproximadamente en 5.000.000. Matrices de densidad moderada oscilan desde aproximadamente 10.000 a aproximadamente en
55 50.000 siendo preferidas en particular y desde aproximadamente 20.000 a aproximadamente 30.000 siendo preferidos especialmente. Matrices de baja densidad son generalmente menores que 10.000, prefiriéndose desde

aproximadamente 1.000 a aproximadamente 5.000. Matrices de densidad muy baja son menores que 1.000, prefiriéndose desde aproximadamente 10 a aproximadamente 1.000 y prefiriéndose en particular de aproximadamente 100 a aproximadamente 500. En algunas realizaciones, se pueden usar sustratos múltiples, de composiciones diferentes o idénticas. Así por ejemplo, las matrices grandes pueden comprender una pluralidad de sustratos más pequeños.

Las composiciones comprenden un sustrato. Por "sustrato", "sustrato de matriz" o "soporte sólido" u otros equivalentes gramaticales en la presente memoria se quiere decir cualquier material que se pueda modificar para que contenga sitios individuales discretos apropiados para la unión o asociación de analitos objeto de estudio y es susceptible de al menos un método de detección. Como se apreciará por los expertos en la materia, el número de posibles sustratos es muy grande, e incluye, pero no se limita a, vidrio y vidrio modificado o funcionalizado, plásticos (incluyendo acrílicos, poliestireno y copolímeros de estireno y otros materiales, polipropileno, polietileno, polibutileno, poliuretanos, Teflon™, etc.), polisacáridos, nailon o nitrocelulosa, materiales compuestos, cerámica y resinas plásticas, sílice o materiales a base de sílice incluyendo silicio y silicio modificado, carbono, metales, vidrios inorgánicos, plásticos, haces de fibra óptica y una variedad de otros polímeros. En general, los sustratos permiten la detección óptica y no presentan fluorescencia de manera apreciable.

En una realización, el sustrato comprende el extremo de un haz de fibra óptica. Alternativamente, el sustrato no comprende los extremos de un haz de fibra óptica. Por ejemplo, el sustrato puede ser un sustrato manchado, impreso o fotolitográfico conocido en la técnica; véanse, por ejemplo, las patentes internacionales WO 95/25116; WO 95/35505; PCT US98/09163; las patentes de EE.UU. N° 5.700.637; 5.807.522 y 5.445.934 y U.S.S.N. 08/851.203 y 09/187.289 y referencias citadas en las mismas. Una ventaja de usar el extremo distal de un haz de fibra óptica como sustrato en la presente invención es que las fibras individuales en contacto con cada pozo se pueden usar para transportar luz tanto de excitación como de emisión a y desde los pozos, permitiendo la interrogación remota de los contenidos de los pozos. Además, una matriz 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 una realización, el sustrato es plano, aunque como se apreciará por los expertos en la materia, se pueden usar también otras configuraciones de sustratos; por ejemplo, se pueden usar configuraciones tridimensionales. Los sustratos preferidos incluyen haces de fibra óptica como se discute más adelante y sustratos planos lisos tales como vidrio, poliestireno y otros plásticos y acrílicos.

En una realización, se modifica al menos una superficie del sustrato para contener sitios individuales discretos (también referida en la presente memoria como "recipientes de reacción" y "micropozos") para asociación después de analitos objeto de estudio. Estos sitios comprenden en general sitios modificados físicamente, es decir, configuraciones físicas tales como pozos o pequeñas depresiones en el sustrato que pueden retener las perlas. Los micropozos pueden estar formados como se conoce en general en la técnica usando una variedad de técnicas, incluyendo, pero no limitándose a, fotolitografía, técnicas de estampado, técnicas de moldeado y técnicas de microataque químico. Como se apreciará por los expertos en la materia, la técnica usada dependerá de la composición y forma del sustrato.

En una realización, las modificaciones físicas se realizan en una superficie del sustrato para producir los sitios. En una realización preferida, el sustrato es un haz de fibra óptica y la superficie del sustrato es un extremo terminal del haz de la fibra. En esta realización, los pozos se realizan en un terminal o extremo distal del haz de fibra óptica que comprende fibras individuales. En esta realización, los centros de las fibras individuales son atacados, con respecto al revestimiento, de manera que se forman pequeños pozos o depresiones en un extremo de las fibras. La profundidad requerida de los pozos dependerá del tamaño de las perlas que se tienen que añadir a los pozos. En un aspecto de la presente invención, las modificaciones físicas se pueden realizar como se explica en las patentes de EE.UU. 6.023.540; 6.327.410 y 6.858.394.

Los sitios pueden ser un patrón, es decir, un diseño o configuración regular, o estar distribuidos de manera aleatoria. Una realización preferida utiliza un patrón regular de sitios de manera que los sitios se puedan estudiar en el plano de coordenadas X-Y. "Patrón" en este sentido incluye una célula unitaria repetida, preferiblemente una que permita una alta densidad de perlas en el sustrato.

Para uso en la presente invención, los recipientes de reacción presentan un volumen que oscila desde aproximadamente 10 attolitros a aproximadamente 50 picolitros. Alternativamente, los recipientes de reacción oscilan en tamaño desde aproximadamente 1 femtolitro a aproximadamente 1 picolitro. En una alternativa más, los recipientes de reacción oscilan desde aproximadamente 30 femtolitros a aproximadamente 60 femtolitros.

En un aspecto de la presente invención, la matriz es una matriz de fibra óptica. La matriz, según una realización, se puede realizar como sigue. Primero, los recipientes de reacción se forman sobre un extremo distal de un haz de fibra óptica. Según una realización, los recipientes se crean usando un procedimiento de ataque químico, tal como, por ejemplo, un procedimiento de ataque con ácido, dando como resultado recipientes de reacción del volumen deseado. Esto es, el procedimiento de ataque químico crea depresiones o huecos en el material del centro en el extremo del haz de fibras, aunque no se afecta al material de revestimiento, dando como resultado así recipientes de

reacción. Alternativamente, se ataca tanto el material del centro como el material de revestimiento, pero el material de revestimiento es atacado a una velocidad menor que el material del centro, dando como resultado de ese modo recipientes de reacción. Una ventaja del formato de matriz de fibra óptica es que evita un procedimiento de microfabricación complicado y proporciona la capacidad para observar muchos recipientes de reacción simultáneamente.

II. Componentes de captura.

Los micropozos de la presente invención comprenden al menos un componente de captura. Un componente de captura (también referido como un "ligando de unión de captura", "ligando de unión", "especies de unión de captura" o "sonda de captura") es cualquier modificación de molécula, compuesto o micropozo que se pueda usar como sonda para ataque, unión o captura de otro modo de un analito objeto de estudio dentro de un micropozo sobre el sustrato, de manera que el analito objeto de estudio se inmoviliza durante el ensayo. En general, el ligando o componente de unión de captura permite la unión de un analito objeto de estudio al micropozo, para los fines de detección, cuantificación u otro análisis.

Como se apreciará por los expertos en la materia, la composición del componente de captura dependerá de la composición del analito objeto de estudio. Los componentes de captura para una extensa variedad de análisis son conocidos o se pueden encontrar fácilmente usando técnicas conocidas. Por ejemplo, cuando el analito es una proteína, los componentes de captura o ligandos de unión incluyen proteínas (en particular incluyendo anticuerpos o fragmentos de las mismas (FABs, etc.)) o moléculas pequeñas. Las proteínas de componentes de captura preferidas incluyen péptidos. Por ejemplo, cuando el analito es una enzima, los ligandos de unión adecuados incluyen sustratos e inhibidores. Los pares antígeno - anticuerpo, ligandos de receptor y carbohidratos y sus parejas de unión son también pares de ligandos de unión de analito adecuados. Además, cuando el analito es un ácido nucleico monocatenario, el ligando de unión puede ser un ácido nucleico complementario. Similarmente, el analito puede ser una proteína de unión de ácido nucleico y el ligando de unión de captura es ácido nucleico monocatenario o bicatenario; alternativamente, el ligando de unión puede ser una proteína de unión de ácido nucleico cuando el analito es un ácido nucleico mono o bicatenario. Alternativamente, como se describe en general 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 relacionadas, se pueden desarrollar "aptómeros" de ácidos nucleicos para unión a virtualmente cualquier analito objeto de estudio. Como se apreciará por los expertos en la materia, se pueden usar dos moléculas cualesquiera que se asocien, como un analito o como el componente de captura. Similarmente, hay una amplia bibliografía relativa al desarrollo de componentes de captura basándose métodos de química combinatoria.

Pares de 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 glucoproteínas y glucolípidos)/lectinas, proteínas/proteínas, proteínas/moléculas pequeñas y también son adecuados pares de ligandos de unión de analito los carbohidratos y sus parejas de unión. Estos pueden ser secuencias naturales o derivadas. Según una realización, los componentes de captura son porciones (en particular las porciones extracelulares) de receptores superficiales de células que se sabe que multimerizan, tal como el receptor de hormona del crecimiento, transportadores de glucosa (en particular receptor de GLUT 4), receptor de transferencia, receptor de factor de crecimiento epidérmico, receptor de lipoproteínas de baja densidad, receptor de lipoproteínas de alta densidad, receptor de factor de crecimiento epidérmico, receptor de leptina, receptores de interleucina incluyendo receptores IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15 e IL-17, receptor de hormona del crecimiento humana, receptor de VEGF, receptor de PDGF, receptor de EPO, receptor de TPO, receptor de factor neurotrófico ciliar, receptor de prolactina y receptores de células T.

En una realización preferida, el componente de captura se une al micropozo o recipiente de reacción como se indica en líneas generales en la presente memoria, por ejemplo vía un "componente de unión" (también referido en la presente memoria como un "ligador de unión"). Un "componente de unión", como se usa en la presente memoria, se define como cualquier componente, funcionalización o modificación de los micropozos que da como resultado la unión del componente de captura y puede incluir enlaces y/o ligadores. Alternativamente, el componente de captura puede utilizar un componente extendedor de captura. En esta realización, el componente de captura o ligando de unión comprende una primera porción que unirá el analito objeto de estudio y una segunda porción que se puede usar para unión a la superficie.

El método de unión del ligando de unión de captura al ligador de unión se hará en general como se conoce en la técnica y dependerá de la composición del ligador de unión y el ligando de unión de captura. En general, los ligandos de unión de captura están unidos a ligador de unión por el uso de grupos funcionales sobre cada uno que se pueden usar después para unión. Según una realización, el grupo funcional es una funcionalidad química. Esto es, la superficie del micropozo se derivatiza de manera que una funcionalidad química se una a la superficie. Los grupos funcionales preferidos para unión son grupos amino, grupos carboxi, grupos oxo y grupos tiol. Estos grupos funcionales se pueden unir después, directamente o por el uso de un ligador, a veces referido en la presente memoria como un "ligador cruzado". Los ligadores son conocidos en la técnica; por ejemplo, ligadores homo o heterobifuncionales como se conoce (véase 1994 Pierce Chemical Company catalog, technical section on cross-linkers, páginas 155-200). Los ligadores preferidos incluyen, pero no se limitan a, grupos alquilo (incluyendo grupos alquilo sustituidos y grupos alquilo que contienen restos heteroatómicos), siendo preferidos grupos alquilo cortos,

ésteres, amida, amina, grupos epoxi y etilenglicol y derivados. Los ligadores también pueden ser un grupo sulfona, formando sulfonamida.

5 Según una realización, el grupo funcional es un grupo funcional activado por la luz. Esto es, el grupo funcional puede ser activado por la luz para unirse al analito objeto de estudio o al ligador cruzado. Un ejemplo es la tecnología PhotoLink™ disponible en SurModics, Inc. en Eden Prairie, MN.

10 En un aspecto alternativo de la invención, se añade el grupo funcional sin derivatizar la superficie del pozo. Esto es, los grupos funcionales se pueden añadir a la superficie por adición de una molécula con un grupo funcional unido unida, en la que la molécula presenta una afinidad de unión por la superficie del pozo. La molécula, según una realización es albúmina de suero bovino. Alternativamente, la molécula es cualquier proteína capaz de unirse o adherirse a la superficie del recipiente. En una alternativa más, la molécula es cualquier molécula capaz de unirse o adherirse a la superficie del recipiente. En un ejemplo, la molécula es albúmina de suero bovino con grupos amino libres en su superficie. El ligador cruzado se puede añadir después para unirse a los grupos amino.

15 Según una realización ejemplar en que el componente de captura es un ligador cruzado químico, el analito objeto de estudio se une usando ligadura cruzada química de la siguiente manera. Primero, la superficie del recipiente de reacción se derivatiza con un grupo funcional tal como NH_2 . A continuación, se añade el ligador cruzado y el analito objeto de estudio a la matriz de manera que el ligador cruzado se une al NH_2 y el analito objeto de estudio se une al ligador cruzado. En una realización alternativa descrita con más detalle a continuación en que el analito objeto de estudio no es una enzima, también se puede unir una etiqueta con un componente enzimático al analito objeto de estudio.

20 De esta manera, se pueden añadir ligandos de unión de captura que comprenden proteínas, lectinas, ácidos nucleicos, moléculas orgánicas pequeñas, carbohidratos, etc.

25 Una realización utiliza componentes de captura proteínicos o ligandos de unión de captura. Como se sabe en la técnica, se puede usar cualquier número de técnicas para unir un ligando de unión de captura proteínico. "Proteína" en este contexto incluye proteínas, polipéptidos, péptidos, incluyendo, por ejemplo, enzimas. Se sabe que una amplia variedad de técnicas añade restos a proteínas. Un método preferido se indica en líneas generales en la patente de EE.UU. N° 5.620.850. La unión de proteínas a superficies es conocida; véase también Heller, Acc. Chem. Res. 23: 128 (1.990) y trabajo relacionado.

30 Una realización alternativa utiliza ácidos nucleicos como el ligando de unión de captura, por ejemplo para cuando el analito objeto de estudio es un ácido nucleico a una proteína de unión de ácidos nucleicos o cuando el ácido nucleico sirve como un aptámero para unión a proteína, como se conoce en la técnica.

Según una realización, cada micropozo comprende una pluralidad de componentes de captura. La pluralidad de componentes de captura, en un aspecto de la invención, se distribuye sobre la superficie del pozo como un "césped". Alternativamente, los componentes de captura se distribuyen de cualquier modo conocido.

35 La unión entre el componente de captura y el analito objeto de estudio, según una realización, es específico y el componente de captura es parte de un par de unión. Esto es, el componente de captura es un componente de captura específico, objeto de estudio, que se une de manera específica con, o presenta especificidad por, el analito objeto de estudio. Más específicamente, el componente de captura se une de manera específica y directamente al analito objeto de estudio. Por "unión de manera específica" o "especificidad de unión" en la presente memoria se quiere decir que el componente de captura se une al analito con suficiente especificidad para diferenciar entre el analito y otros componentes o contaminantes de la muestra de ensayo. Por ejemplo, el componente de captura según una realización es un anticuerpo que se une de manera específica a alguna porción del analito objeto de estudio. El anticuerpo, según una realización, puede ser cualquier anticuerpo capaz de unirse de manera específica a un analito objeto de estudio. Por ejemplo, los anticuerpos apropiados incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos monoclonales, anticuerpos biespecíficos, minicuerpos, anticuerpos de dominio, anticuerpos sintéticos (a veces referidos como "miméticos de anticuerpo"), anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, fusiones de anticuerpos (a veces referidas como "conjugados de anticuerpo") y fragmentos de cada uno, respectivamente.

50 Sin embargo, como se apreciará por los expertos en la materia, es posible detectar analitos usando unión que no sea altamente específica; por ejemplo, los sistemas pueden usar diferentes componentes de captura tales como, por ejemplo, una matriz de diferentes ligandos y la detección de cualquier analito particular es vía su "distintivo" de unión a un panel de ligandos de unión, similar a la manera en que funcionan los "ruidos electrónicos". Esto encuentra utilidad particular en la detección de analitos químicos. La unión debería ser suficiente para quedar ligada en las condiciones del ensayo, incluyendo etapas de lavado para retirar unión no específica. En algunas realizaciones, por ejemplo en la detección de ciertas biomoléculas, las constantes de unión del analito al ligando de unión serán al menos aproximadamente 10^4 - 10^6 M^{-1} , siendo preferido al menos aproximadamente 10^5 a 10^9 M^{-1} y siendo preferido en particular al menos aproximadamente 10^7 - 10^9 M^{-1} .

Según una realización en que el analito objeto de estudio es una célula, incluyendo, por ejemplo, células bacterianas, el componente de captura es una molécula de receptor de adhesina. En el uso, la molécula de receptor

de adhesina se une con una proteína de superficie denominada una adhesina sobre la superficie extracelular de la célula objeto de estudio, inmovilizando o capturando de ese modo la célula. Alternativamente, en realizaciones en que el analito objeto de estudio es otro tipo de célula (una célula no bacteriana), el componente de captura es un receptor de superficie celular apropiado que une la célula analito objeto de estudio. En una realización más en que el analito objeto de estudio es una célula, el componente de captura es fibronectina. Por ejemplo, se puede usar fibronectina cuando el analito objeto de estudio 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 de manera específica a un analito objeto de estudio, sino que más bien se une a una pareja de unión correspondiente asociada a, o unida a, el analito objeto de estudio. Por ejemplo, el componente de captura no específico según una realización es un ligador cruzado químico como se describió anteriormente. Según una realización, cada molécula péptica en una muestra objeto de estudio se puede unir al ligador cruzado químico. Este tipo de sistema se puede usar para identificar analitos objeto de estudio, enzimáticos, debido a que los analitos se detectan por modificación del sustrato.

En un ejemplo de un componente de captura no específico según una realización, el componente de captura es estreptavidina, que se une con alta afinidad a biotina y así se une a cualquier molécula a que se haya unido biotina. Alternativamente, el componente de captura es biotina y se une estreptavidina a, o se asocia con, el analito objeto de estudio de manera que el analito objeto de estudio se puede capturar por la biotina.

Según una realización, el componente de captura se añade a los recipientes de reacción de la siguiente manera. Primero, se preparan los micropozos para unión del componente o de los componentes de captura. Esto es, los micropozos se modifican o se añade un componente de unión a los micropozos de manera que el componente o los componentes de captura se unan a los micropozos. En una realización, los micropozos son derivatizados con una funcionalidad química como se describió anteriormente. A continuación, se añade el componente de captura.

Un ejemplo de unión de componentes de captura se representa en la FIG. 1, en que los recipientes de reacción de la presente invención son funcionalizados con biotina. Como se muestra en la FIG. 1a, la matriz de la presente invención en este ejemplo es un haz 10 de fibra óptica. Para unir el componente 18 de captura, los micropozos se modifican primero con un componente 16 de unión, que en este ejemplo es un aminopropilsilano 16 que se liga a las superficies tanto del centro 12 como del revestimiento 14 del extremo distal del haz 10 de fibras, como se muestra en la FIG. 1b. La modificación con aminopropilsilano es eficaz en este ejemplo debido a que NHS-biotina se une a una superficie 16 aminosilanizada. Sin embargo, como el componente 18 de captura debería estar presente sólo dentro de los recipientes de reacción, las superficies externas del sustrato, tales como las superficies externas del revestimiento 14, no se deberían silanizar. Esto es, la silanización se debe eliminar de la superficie 14 de revestimiento externa para evitar la unión de biotina. En este ejemplo como se muestra en la FIG. 1c, la silanización 16 se eliminó de la capa 14 de revestimiento externa puliendo las fibras aminosilanizadas durante 10 segundos con película de pulimento de 0,3 µm, retirando de ese modo la capa de revestimiento aminosilanizada superior.

Después de haber añadido el componente 16 de unión a los micropozos, se puede unir el componente 18 de captura. En el ejemplo en la FIG. 1, el componente 18 de captura es biotina 18. Como se muestra en la FIG. 1d, se une éster 18 succinimidílico de biotina a los grupos 16 amino sobre las superficies 12 de los pozos.

III. Analitos objeto de estudio.

Como se discute la presente memoria, la matriz de la presente descripción proporciona detección, cuantificación y análisis adicional de analitos objeto de estudio. Por "analito objeto de estudio" o "analito" o equivalentes gramaticales en la presente memoria se quiere decir cualquier átomo, molécula, ión, ión molecular, compuesto o partícula que se tiene que detectar o evaluar por parejas de unión.

Según una realización, el analito objeto de estudio es una enzima. Por ejemplo, la enzima puede ser una enzima de cualquiera de las seis clasificaciones de enzimas: oxidoreductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas y ligasas. Así, las enzimas apropiadas incluyen, pero no se limitan a, polimerasas, catepsinas, calpaínas, aminotransferasas tales como, por ejemplo, AST y ALT, proteasas tales como, por ejemplo, caspasas, nucleótido nucleótido ciclasas, transferasas, lipasas, enzimas asociadas a paros cardíacos y similares. Cuando se usa el sistema de la presente descripción para detectar objetos de estudio víricos o bacterianos, las enzimas apropiadas incluyen polimerasas víricas o bacterianas y otras de tales enzimas, incluyendo proteasas víricas o bacterianas.

Alternativamente, el analito objeto de estudio presenta un componente enzimático. Por ejemplo, el analito objeto de estudio puede ser una célula que tiene una enzima o componente enzimático presente sobre su superficie extracelular. Alternativamente, el analito objeto de estudio es una célula que no tiene componente enzimático. Dicha célula se identifica típicamente usando un método de ensayo indirecto descrito a continuación tal como un ensayo "sándwich".

Según otra realización, el analito objeto de estudio no es una enzima. Como apreciarán los expertos en la materia, se puede usar un gran número de analitos en la presente invención; básicamente, se puede usar cualquier analito objeto de estudio que se una a un componente de captura y/o un ligando de unión secundario. Como se explicará

con más detalle a continuación, estos analitos objeto de estudio se identifican típicamente usando un ensayo indirecto tal como un ensayo "sándwich". Como se mencionó anteriormente, un analito objeto de estudio adecuado es una célula. Además, los analitos adecuados incluyen moléculas orgánicas e inorgánicas, incluyendo biomoléculas. En una realización preferida, el analito objeto de estudio es una proteína. Como se apreciará por los expertos en la materia, hay un gran número de posibles analitos, objeto de estudio, proteínicos que se pueden detectar o evaluar por parejas de unión usando la presente invención. Además de enzimas como se discutió anteriormente, los analitos proteínicos objeto de estudio, adecuados incluyen, pero no se limitan a, (1) inmunoglobulinas; (2) hormonas y citocinas (muchas de las cuales sirven como ligandos para receptores celulares) y (3) otras proteínas.

Según una realización en que el analito objeto de estudio no es una enzima y se realiza un ensayo sándwich como se describe con más detalle a continuación, la etiqueta enzimática como se describe con más detalle a continuación puede ser beta-galactosidasa. Alternativamente, la etiqueta enzimática puede ser, pero no se limita a, fosfatasa alcalina o peroxidasa de rábano.

Los analitos objeto de estudio, adecuados, adicionales incluyen, pero no se limitan a, un contaminante medioambiental (incluyendo pesticidas, insecticidas, toxinas, etc.); un producto químico (incluyendo disolventes, polímeros, materiales orgánicos, etc.); moléculas terapéuticas (incluyendo compuestos terapéuticos y fármacos de abuso, antibióticos, etc.); biomoléculas (incluyendo hormonas, citocinas, proteínas, ácidos nucleicos, lípidos, carbohidratos, antígenos de membrana celular y receptores (receptores neuronales, hormonales, de nutrientes y de superficie celular) o sus ligandos, etc.); células completas (incluyendo células procariotas (tales como bacterias patógenas) y eucariotas, incluyendo células de tumores de mamíferos); virus (incluyendo retrovirus, herpesvirus, adenovirus, lentivirus, etc.) y esporas; etc.

IV. Sustrato enzimático

Después de que se captura el analito o los analitos objeto de estudio dentro del micropozo o los micropozos (y después de una etapa de lavado, según ciertas realizaciones), se añade un componente de reacción a la matriz. Mediante "componente de reacción", como se usa en la presente memoria, se quiere decir una molécula que afecta a una reacción enzimática cuando se pone en contacto con una enzima o molécula enzimática. Por "afecta a" una reacción se quiere decir que incluye, pero no se limita a, inducir, activar o modificar (por ejemplo, retardar o acelerar) una reacción o inhibir una reacción. Según una realización, el componente de reacción es un sustrato enzimático cromogénico. Un "sustrato enzimático cromogénico" como se usa en la presente memoria es cualquier molécula que se convierte mediante una enzima en un producto cromogénico como resultado de una reacción enzimática. "Cromogénico" significa que se refiere a color o pigmento en el espectro óptico (luz visible) que incluye fluorogénico.

Se entiende en la técnica que se conocen sustratos cromogénicos o se pueden preparar por enzimas en cualquiera de las seis clasificaciones de enzimas. Así, se puede usar en la presente invención cualquier sustrato cromogénico conocido capaz de producir un producto cromogénico en una reacción como una enzima particular, incluyendo cualquiera de los sustratos enzimáticos cromogénicos descritos en *El Manual— A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies, Décima Ed.*, Capítulo 10, (<http://probes.invitrogen.com/handbook/sections/1000.htm>).

Según una realización en que el ensayo de la presente invención es un ensayo de sándwich como se describe en la presente memoria además en que la etiqueta enzimática es beta - galactosidasa, el sustrato añadido a la matriz es un sustrato de beta -galactosidasa tal como resorufin-β-D-galactopiranósido.

V. Métodos de ensayo.

La matriz de la presente descripción se puede usar para diversos métodos de ensayo diferentes. Más específicamente, la presente invención proporciona tanto (a) detección de analito objeto de estudio y (b) cuantificación de concentración de analito objeto de estudio en una muestra.

En general, el sistema o matriz de la presente descripción se expone a un analito de interés (o se pone en contacto con una muestra que contiene un analito de interés) y el analito se inmoviliza mediante un componente de captura en un micropozo, en condiciones adecuadas para inmovilización del analito objeto de estudio a al menos uno de los componentes de captura, es decir, condiciones generalmente fisiológicas. Para los fines de la presente solicitud, el término "inmovilizado" significa unido, ligado o fijado a un componente de captura en un micropozo. Así, la interacción entre una molécula de analito y el componente de captura en un micropozo da como resultado la inmovilización de la molécula de analito dentro de ese micropozo.

Según un aspecto de la invención, la muestra de interés se pone en contacto con la matriz de la presente descripción (o se incuba la matriz en la muestra) durante un periodo de aproximadamente 45 minutos a aproximadamente 75 minutos. Alternativamente, se ponen en contacto la matriz y la muestra durante un periodo de desde aproximadamente 50 minutos a aproximadamente 70 minutos. En una alternativa más, el periodo de incubación es aproximadamente 1 hora.

Según una realización, se realiza una etapa de lavado después de poner en contacto la matriz con la muestra. La

etapa de lavado está destinada a eliminar por lavado cualquier analito objeto de estudio o moléculas no objeto de estudio que no estén ligadas a un componente de captura. Alternativamente, no se requiere etapa de lavado.

5 En un aspecto de la invención, se añade después un ligando de unión secundario a la matriz. En general, se añade el ligando de unión secundario si el ensayo es un ensayo indirecto tal como un "ensayo de sándwich" (cuando el analito objeto de estudio no es una enzima), como se describe con más detalle en la presente memoria. El ligando de unión secundario, como se discutió anteriormente, se asociará con, o se unirá a, el analito objeto de estudio ligado y comprende un componente enzimático. El ligando de unión secundario se añade en una cantidad suficiente para asegurar que un ligando entre en contacto con cada analito objeto de estudio ligado en la matriz. Alternativamente, no se añade ligando de unión secundario, tal como, por ejemplo, cuando el analito objeto de estudio se va a detectar directamente.

10 Un sustrato enzimático cromogénico como se describió anteriormente se introduce después o se añade a la matriz. El sustrato enzimático cromogénico se proporciona en una cantidad suficiente para ponerse en contacto con cualquier analito objeto de estudio capturado. El sustrato elegido reacciona con, o se modifica por, el componente enzimático tal que la reacción produce un producto cromogénico y así una señal óptica. La presencia del producto cromogénico en la matriz puede proporcionar información acerca de la identidad y/o 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).

15 En una realización de la presente invención, los micropozos se sellan después de que se añade el sustrato enzimático. Esto es, se pone un componente de sellado en contacto con la cara del sustrato, aislando fluidamente de ese modo cada micropozo y sellando su contenido en el mismo. Un "componente de sellado", como se usa en la presente memoria, se define como cualquier material o dispositivo suficientemente grande para cubrir la superficie completa del sustrato de la matriz y capaz de poner en contacto la superficie del sustrato de la matriz de manera que se sella cada recipiente de reacción o se aísla de manera que el contenido de cada recipiente no pueda escapar del recipiente. Según una realización, el componente de sellado es un tapón de elastómero de silicona que se pone contra la superficie del sustrato con una presión uniforme por el sustrato completo. Por sellado del contenido en cada micropozo, la reacción enzimática puede transcurrir dentro del micropozo, produciendo de ese modo una cantidad detectable del producto cromogénico que es retenido en el micropozo para fines de detección. Esto es, la enzima convierte el sustrato en un producto cromogénico que se aumenta a una concentración localmente alta en cada recipiente sellado, generando una señal cromogénica detectable.

20 Según una realización, la presente invención proporciona un sistema de microscopio provisto de una plataforma mecánica que aplica el componente de sellado. La plataforma se coloca debajo de la platina del microscopio en el sistema de microscopía. Después de que se han añadido a cada pozo los contenidos de la matriz, el componente de sellado se pone en medio entre una superficie lisa (tal como, por ejemplo, un portaobjeto) y el sustrato de la matriz usando presión uniforme aplicada por la plataforma mecánica.

25 Los ensayos se pueden realizar en una variedad de condiciones experimentales, como apreciarán los expertos en la materia. Se puede incluir una variedad de distintos reactivos en los ensayos de identificación sistemática. Estos incluyen reactivos como sales, proteínas neutras, por ejemplo, albúmina, detergentes, etc, que se pueden usar para facilitar la unión proteína - proteína óptima y/o reducir interacciones no específicas o de fondo. También, se pueden usar reactivos que mejoren de otro modo la eficacia del ensayo, tales como inhibidores de proteasa, inhibidores de nucleasa, 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 de lavado como se conoce en la técnica.

30 Los micropozos que presentan actividad o cambios en su distintivo óptico se pueden identificar por un sistema de tren óptico y detección óptica convencional. Dependiendo de los sustratos enzimáticos cromogénicos particulares usados y las longitudes de onda operativas de sus productos cromogénicos, se pueden emplear fibras ópticas diseñadas para unas longitudes de onda particulares para interrogatorio óptico de los micropozos. En una realización preferida, el sistema o la matriz de la presente invención se usan junto con un haz de fibras ópticas o matriz de fibras ópticas como un sustrato.

35 Según una realización, la matriz de la presente descripción se puede usar junto con un sistema de detección óptica tal como el sistema descrito en la solicitud de patente de EE.UU. N° 09/816.651. Por ejemplo, según una realización, la matriz de la presente descripción es el extremo distal de un conjunto óptico de fibras que comprende un haz de fibras ópticas construido de fibras revestidas de manera que la luz no se mezcla entre las fibras. Como se representa en la Solicitud 09/816.651, el extremo proximal del haz se recibe por una fase de traslación en el eje z y microposicionador x-y.

40 El sistema de detección óptica de la Solicitud de Patente de EE.UU. N° 09/816.651 opera como sigue. Se hace pasar la luz que vuelve del extremo distal del haz por la unión a un cambiador de aumento que permite el ajuste del tamaño de la imagen del extremo proximal o distal de la fibra. La luz que pasa por el cambiador de aumento se cierra después y se filtra mediante una segunda rueda. La luz forma después imagen en una cámara de dispositivo de carga acoplada (CCD, por sus siglas en inglés). Un ordenador ejecuta el programa informático de tratamiento de

la imagen para procesar la información de la cámara CCD y también controlar posiblemente las ruedas de cierre y de filtro primera y segunda.

5 La matriz o el sistema de la presente descripción se pueden unir al extremo distal del haz de fibras ópticas usando una variedad de procedimientos compatibles. Se forman pozos en el centro de cada fibra óptica del haz. Así, cada fibra óptica del haz transporta luz desde el único micropozo formado en el centro del extremo distal de la fibra. Esta característica es necesaria para permitir la interrogación del distintivo óptico de los micropozos individuales para identificar las reacciones en cada micropozo. Por consiguiente, por formación de la imagen el extremo del haz en la matriz CCD, los distintivos ópticos de los micropozos se pueden interrogar de manera individual.

A. Detección

10 En un aspecto de la presente invención, la presente matriz se puede usar para detectar la presencia de un analito objeto de estudio en una muestra. Más específicamente, la invención proporciona un método para detectar el producto de la reacción enzimática como una indicación de la presencia del analito objeto de estudio.

15 El método de detección puede transcurrir directamente o indirectamente. Si el analito objeto de estudio es una enzima, el analito se puede identificar por un método directo de detección. Alternativamente, si el analito objeto de estudio no es una enzima y así no puede producir un producto cromogénico en presencia de un sustrato enzimático cromogénico, el analito es identificado por un método indirecto de detección.

El método directo de detección, que implica un analito objeto de estudio que es una enzima, transcurre como sigue. Primero, la muestra de interés y la matriz se ponen en contacto como se describió con más detalle anteriormente en condiciones adecuadas. Con posterioridad, se añade el sustrato enzimático cromogénico.

20 La presencia o ausencia del analito objeto de estudio en cualquier micropozo determinado se detecta después por interrogación óptica. Esto es, se detecta cualquier cambio en la señal óptica causada por producción de un producto cromogénico. En cualquier micropozo que contenga el analito objeto de estudio, el analito modifica o actúa sobre el sustrato de alguna manera, dando como resultado de ese modo la liberación de un producto cromogénico, dando como resultado un cambio en la señal óptica del micropozo. El producto de reacción cromogénico es detectado entonces ópticamente.

En una realización de la presente invención, los micropozos son sellados después de añadir el sustrato enzimático, como se describió anteriormente.

30 Los métodos indirectos de detección implican un analito objeto de estudio que no presenta propiedades enzimáticas. Dos métodos indirectos que se pueden usar con la presente invención son el ensayo de "sándwich" y el ensayo "competitivo".

35 Se puede realizar un ensayo de sándwich como se representa en la FIG. 2. Primero, se ponen en contacto la muestra de interés y la matriz 10 como se muestra en la FIG. 2a y como se describió con más detalle anteriormente. En condiciones adecuadas, el analito 12 objeto de estudio, presente en la muestra, es capturado por los componentes 16 de captura en los micropozos 14, como se muestra en la FIG. 2b. Según una realización, se realiza después una etapa de lavado.

40 A continuación, se añade un ligando 18 de unión de disolución (también referido en la presente memoria como un "ligando de unión secundario") a la matriz 10, como se muestra en la FIG. 2c. Los ligandos 18 de unión de disolución son similares a los componentes 16 de captura en que se unen a analitos 12 objeto de estudio. El ligando 18 de unión de disolución puede ser el mismo o diferente del ligando 16 de unión de captura. La unión del ligando 18 de unión de disolución a un analito 12 objeto de estudio capturado forma un "sándwich" de los tipos. En ausencia del analito objeto de estudio, se elimina por lavado el ligando 18 de unión de la disolución.

45 Un ligando 18 de unión de la disolución presenta dos componentes - un componente 22 de unión y una etiqueta 24 enzimática. El componente 22 de unión es la porción de ligando 18 de unión de la disolución que se une al analito 12 objeto de estudio. Típicamente, el ligando 18 de unión de la disolución se une a una porción diferente del analito 12 objeto de estudio que el componente 16 de captura, debido a que si tanto el componente 16 de captura como el ligando 18 de unión de la disolución se tuvieran que unir a la misma porción, el ligando 18 de unión de la disolución no podría unirse a un analito 12 objeto de estudio capturado. Así, el ligando 18 de unión secundario, elegido, se puede unir al analito 12 objeto de estudio mientras que el analito 12 objeto de estudio está ligado a un micropozo 14 vía un componente 16 de captura.

50 La etiqueta 24 enzimática es la porción del ligando 18 de unión de la disolución que presenta actividad enzimática. Según una realización, la etiqueta 24 enzimática es una enzima unida al ligando 18 de unión de la disolución.

Con posterioridad, se añade el sustrato enzimático cromogénico.

En una realización de la presente invención, se sellan los micropozos después de que se añade el sustrato enzimático, como se describió anteriormente.

La presencia o ausencia del analito objeto de estudio en cualquier micropozo determinado se detecta entonces por interrogación óptica. Esto es, se detecta cualquier cambio en la señal óptica ocasionado por la producción de un producto cromogénico. En cualquier micropozo que contenga el analito objeto de estudio y el ligando de unión secundario, la enzima asociada al ligando de unión secundario modifica o actúa sobre el sustrato de algún modo, produciendo de ese modo un producto cromogénico, dando como resultado un cambio en la señal óptica del micropozo. El producto se detecta entonces de manera óptica.

El ensayo competitivo opera como sigue. Primero, se añade una molécula etiquetada a la matriz de la presente invención, en la que la etiqueta es una enzima o componente enzimático. En esta realización, la molécula etiquetada elegida se une con el componente de captura de manera que la adición de la molécula etiquetada a la matriz da como resultado moléculas etiquetadas que se ligan a componentes de captura en los micropozos.

A continuación, la muestra de interés y la matriz se ponen en contacto como se describió con más detalle anteriormente. La presencia del analito objeto de estudio en la matriz ocasiona el desplazamiento de la molécula etiquetada y la unión del analito a los componentes de captura. El desplazamiento tiene lugar por la siguiente razón: en esta realización, el componente de captura elegido es capaz de unirse a cualquiera de, la molécula etiquetada o el analito objeto de estudio, dando como resultado así una situación de unión competitiva. Como resultado, si se liga una molécula etiquetada a un componente de captura en un micropozo y se añade un analito objeto de estudio, el analito objeto de estudio desplazará la molécula etiquetada en condiciones adecuadas.

Según una realización, se realiza después una etapa de lavado para eliminar las moléculas etiquetadas no ligadas de la matriz.

Con posterioridad, se añade el sustrato enzimático cromogénico. Y como se discutió anteriormente, según un aspecto de la invención, se sellan los micropozos después de que se añade el sustrato enzimático. Alternativamente, no se sellan los micropozos.

La presencia o ausencia del analito objeto de estudio en cualquier micropozo determinado se detecta entonces por interrogación óptica. Pero a diferencia de las interrogaciones ópticas que se describieron anteriormente, en esta interrogación es la ausencia de un producto cromogénico lo que indica la presencia del analito objeto de estudio en el micropozo. En cualquier micropozo que contiene el analito objeto de estudio, no tiene lugar acción enzimática y no tiene lugar cambio en la señal óptica del micropozo. Por el contrario, en cualquier micropozo en que aún esté presente la molécula etiquetada, se detecta una señal óptica.

En una versión alternativa de la realización de ensayo competitivo, tanto la molécula etiquetada como la muestra de interés se añaden a la matriz al mismo tiempo en volúmenes fijados. En esta versión, el analito objeto de estudio y la molécula etiquetada compiten directamente por los sitios de unión sobre los componentes de captura.

1. Subpoblaciones de componentes de captura idénticos para el mismo analito objeto de estudio.

Según una realización de detección, se usa redundancia de sensores. En esta realización, se usa una pluralidad de recipientes de reacción que comprenden componentes de captura idénticos referidos como "subpoblaciones". Esto es, cada subpoblación comprende una pluralidad de componentes de captura idénticos presentes en los micropozos de la matriz. Además, según una realización, cada subpoblación comprende una pluralidad de micropozos que comprende componentes de captura idénticos. Por el uso de una serie de componentes de captura idénticos para una matriz determinada, se puede combinar la señal óptica de cada micropozo para la subpoblación y cualquier número de series de análisis estadísticos, como se indica en líneas generales a continuación. Esto se puede hacer por una variedad de razones. Por ejemplo, en mediciones variables con el tiempo, la redundancia puede reducir significativamente el ruido en el sistema. Para mediciones no basadas en el tiempo, la redundancia puede aumentar significativamente la confianza de los datos.

El número de subpoblaciones, según una realización, puede oscilar desde 2 a cualquier número de subpoblaciones posibles dadas las limitaciones de cualquier matriz conocida y el número de componentes de captura diferentes. Alternativamente, el número puede oscilar desde aproximadamente 2 a aproximadamente 10. En una alternativa más, el número puede oscilar de aproximadamente 2 a aproximadamente 5.

En una realización, se usa una pluralidad de componentes de captura idénticos. Como apreciarán los expertos en la materia, el número de componentes de captura idénticos en una subpoblación variará con la aplicación y el uso de la matriz de sensores. En general, donde quiera se pueden usar de 2 a miles de componentes de captura idénticos en una subpoblación determinada, siendo preferido de 2 a 100, siendo particularmente preferido 2 a 50 y siendo especialmente preferido de 5 a 20. En general, los resultados preliminares indican que más o menos 10 componentes de captura idénticos en una subpoblación proporcionan una ventaja suficiente, aunque para algunas aplicaciones, se pueden usar más componentes de captura idénticos.

Una vez obtenidas, se pueden manipular y analizar las señales de respuesta óptica de una pluralidad de micropozos en cada subpoblación (esto es, con el mismo componente de captura) en una amplia variedad de formas, incluyendo ajuste de los valores de referencia, promediado, análisis de la desviación estándar, distribución y análisis de grupos, análisis de intervalos de confianza, ensayo de la media, etc.

2. Múltiples componentes de captura diferentes para el mismo analito objeto de estudio.

- Además de la redundancia de sensores, la matriz de la presente descripción según una realización, utiliza una pluralidad de componentes de captura que se dirigen a un único analito objeto de estudio pero no son idénticos. Esta realización proporciona más de un componente de captura diferente en cada micropozo o diferentes componentes de captura en diferentes micropozos. En un ejemplo, se puede proporcionar un único analito objeto de estudio al que se pueden unir dos o más componentes de captura. Esto añade un nivel de confianza ya que las interacciones de uniones no específicas se pueden minimizar estadísticamente. En esta realización, cuando se tienen que evaluar analitos objeto de estudio proteínicos, las realizaciones preferidas utilizan componentes de captura que se unen a diferentes partes del objeto de estudio. Por ejemplo, cuando se usan dos o más anticuerpos (o fragmentos de anticuerpo) para diferentes porciones de la misma proteína objeto de estudio como componentes de captura, las realizaciones preferidas utilizan anticuerpos para diferentes epítomos. De manera similar, cuando se tienen que evaluar analitos objeto de estudio de ácido nucleico, las sondas de ácidos nucleicos redundantes pueden estar solapadas, adyacentes o separadas espacialmente. Sin embargo, se prefiere que dos sondas no compitan por un único sitio de unión, así 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 siendo especialmente preferido de aproximadamente 2 a aproximadamente 10 y prefiriéndose en particular de 2 a aproximadamente 5, incluyendo 2,3, 4 ó 5. Sin embargo, como anteriormente, también se pueden usar más, dependiendo de la aplicación.

3. Múltiples componentes de captura diferentes para múltiples analitos objeto de estudio.

- Según una realización, la matriz de la presente descripción utiliza una pluralidad de diferentes componentes de captura que se dirigen a una pluralidad de analitos objeto de estudio. Esta realización incluye más de un componente de captura diferente en cada micropozo o diferentes componentes de captura en diferentes micropozos. En un ejemplo, se pueden proporcionar dos o más analitos objeto de estudio a los que se pueden unir dos o más componentes de captura en los mismos micropozos o diferentes micropozos.
- En esta realización, se puede identificar más de un analito objeto de estudio. Por ejemplo, se pueden identificar dos o más analitos objeto de estudio siempre que cada analito diferente sea una enzima diferente o presente un componente enzimático diferente tal como una molécula de superficie enzimática. En una realización, se identifican los analitos objeto de estudio usando múltiples sustratos enzimáticos en los que cada sustrato produce un diferente color en la interacción con la enzima apropiada. Así, cada analito objeto de estudio se puede distinguir basándose en el color producido por reacción con el sustrato. En una realización alternativa, los analitos objeto de estudio se identifican usando múltiples sustratos que produzcan cada uno el mismo color. Así, cada analito objeto de estudio se puede distinguir añadiendo los sustratos de manera secuencial.
- En esta realización, se puede usar una pluralidad de diferentes componentes de captura, prefiriéndose de aproximadamente 2 a aproximadamente 20 y siendo especialmente preferido de aproximadamente 2 a aproximadamente 10 y prefiriéndose en particular de 2 a aproximadamente 5, incluyendo 2, 3, 4 ó 5. Sin embargo, como anteriormente, también se pueden usar más, dependiendo de la aplicación.

Obsérvese que cada una de las diferentes configuraciones de ensayo anteriores, incluyendo las subpoblaciones de componentes de captura dirigidas a diferentes analitos objeto de estudio y la pluralidad de componentes de captura dirigidos al mismo analito, también se pueden utilizar para cuantificación como se describe más adelante.

40 B. Cuantificación

- Según la presente invención, la presente matriz no solo se puede utilizar para detectar un analito objeto de estudio en una muestra, sino también para cuantificar el analito en la muestra. Esto es, hay una correlación entre el porcentaje de recipientes de reacción que contiene analitos objeto de estudio 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 objeto de estudio en una muestra basándose en el porcentaje de micropozos que capturó un analito objeto de estudio.

- Sin estar limitados por la teoría, el método de cuantificación se conduce en parte por el hecho de que el número y volumen de recipientes de reacción empleados gobiernan el intervalo dinámico de concentraciones que se puede determinar por esta técnica. Esto es, basándose en el número y volumen de los recipientes de reacción en una matriz de la presente invención, se puede realizar una estimación del intervalo de concentraciones de analito objeto de estudio en disolución que permite que se determine la concentración usando el método de la presente invención.

- Por ejemplo, para una matriz como se describe en el Ejemplo 2, teniendo cada recipiente de reacción un volumen de 46 fl, una disolución con una concentración de $3,6 \times 10^{-11}$ M de β -galactosidasa proporcionará, de promedio, una molécula de enzima por recipiente. Sin embargo, es importante observar que distribuir una disolución con una concentración de analito objeto de estudio dentro del intervalo apropiado en una matriz 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 otros tendrán cero. En el caso en que el número de moléculas de enzima por recipiente sea alto, los datos se pueden ajustar a una distribución Gaussiana. Como la relación de moléculas de enzima a recipientes de reacción se aproxima a cero, se aplica la distribución de Poisson. Esta distribución limitante se usa para calcular la probabilidad de casos raros que tienen lugar en un número de pruebas grande. Por ejemplo, basándose en la estadística de Poisson, para una concentración de $3,6 \times 10^{-11}$ M, se observa una distribución entre cero y cinco moléculas de enzima por contenedor, siendo cero y uno los valores más probables.

Se puede usar la ecuación 1 para determinar la probabilidad de observar v casos basándose en el número promedio esperado de casos por prueba, μ

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

Si las concentraciones usadas son mucho menores que $3,6 \times 10^{-11}$ M, el promedio esperado llega a ser excepcionalmente bajo, la distribución es estrecha y la probabilidad de observar cualquiera distinto de 0 o 1 casos 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 de enzimas volumétrica es aproximadamente lineal. Así, basándose en este conocimiento, la matriz de la presente invención se puede usar para determinar la concentración de un analito objeto de estudio en una muestra por un sistema de lectura digital simple 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 referido como un "sistema de lectura binario") que incluye detectar primero los analitos objeto de estudio en la matriz de micropozos por cualquier método de detección descrito anteriormente. El número de recipientes de reacción se cuenta después y se calcula un porcentaje del número total de recipientes de reacción. Esto es, la utilización de una respuesta sí o no, junto con la matriz de alta densidad de recipientes de reacción, permite la lectura digital de concentraciones volumétricas de β -galactosidasa. Esta lectura se realiza por conteo de los recipientes que contienen una molécula de enzima activa por la matriz, correlacionándose el porcentaje de "pozo activo" resultante con la concentración de enzima. Dado el gran número de recipientes interrogados simultáneamente en la matriz de la presente invención, la relación de moléculas de enzima a recipientes de reacción podía ser tan bajo como 1: 500 ya que el gran número de pozos proporciona una señal significativa estadísticamente incluso a esta baja relación.

Sin estar limitados por la 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 pueden considerar con una resolución aceptable. Así, ampliar el número de recipientes que son interrogados usando chips CCD de mayor densidad disminuirá el límite de detección ya que el límite inferior se define por la estadística del número pequeño de pozos activos que se ilumina a las menores concentraciones objeto de estudio. Por otra parte, el límite superior del intervalo dinámico se controla por la desviación pozo a pozo de una lectura binaria. A medida que aumentan las concentraciones objeto de estudio, se pierde la lectura binaria ya que una distribución Gaussiana llega a ser una mejor aproximación de unión de moléculas objeto de estudio. Mayores concentraciones de objeto de estudio conducen a una amplia distribución en el número de moléculas enzimáticas que pueden ocupar cada pozo y por consiguiente, la transición a un aumento no lineal en el porcentaje de pozos activos.

Las limitaciones de esta técnica se realizan por encima y por debajo de los umbrales del intervalo dinámico. Como la concentración va por debajo del límite inferior del intervalo dinámico, el número de moléculas de enzima es demasiado bajo para observar pozos suficientemente ocupados y, por lo tanto, el número de pozos se debe aumentar para asegurarse de que un número estadísticamente significativo de ellos esté ocupado por moléculas de enzima. Los resultados para concentraciones extremadamente diluidas presentan grandes errores relativos asociados a 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 error grande. El límite superior último para esta técnica tiene lugar cuando el 100% de los recipientes de reacción contiene al menos una molécula de enzima. En este límite, la discriminación entre dos disoluciones de concentraciones altas de enzima no es factible. Como el porcentaje de recipientes activos se aproxima al 100%, la linealidad entre concentración y porcentaje de recipiente activo se pierde. Esta situación da como resultado una distribución de ensanchamiento ya que una distribución normal llega a ser una aproximación cada vez mejor de los resultados.

En un aspecto de la presente invención, la matriz también se puede usar para analizar cinética enzimática. "Cinética enzimática) como se usa en la presente memoria se refiere al estudio de las velocidades de reacciones controladas por enzimas. Se entiende en la técnica 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 refiere como 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 llega a estar saturada. Así, si se representa gráficamente la velocidad de reacción como una función de la concentración de sustrato, la línea aumenta inicialmente linealmente con un aumento en el sustrato y después empieza a estabilizarse a medida que la concentración de sustrato se aproxima a la saturación.

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

- 5 Según una realización, se examina la cinética de la siguiente manera. Se permite que el analito objeto de estudio se una al componente de captura, se añade el sustrato y se sella el recipiente de reacción. Dado que está presente una cantidad finita de sustrato en el recipiente de reacción y que no se puede añadir más sustrato debido al sellado del recipiente, se puede determinar la velocidad de la reacción basándose en la cantidad de producto cromogénico detectado con el tiempo.

10 C. Señal y sensibilidad aumentadas

En una realización, la presente invención considera una nanopartícula metálica o semiconductora unida a una biomolécula y preferiblemente una pluralidad de biomoléculas (por ejemplo, oligonucleótidos) para aumentar la señal y sensibilidad para las diversas realizaciones de detección y cuantificación de una sola molécula descritas anteriormente. En una realización, las biomoléculas (por ejemplo, oligonucleótidos) se etiquetan con moléculas fluorescentes en los extremos no unidos a la nanopartícula. No se pretende que la presente invención esté limitada al tipo de nanopartícula o al uso de simplemente un tipo de nanopartícula en un ensayo. En algunas realizaciones, se emplean dos o más tipos o tamaños diferentes de nanopartícula. Por ejemplo, debido a que las nanopartículas de oro de diferente tamaño especificado (por ejemplo, 50 nm y 100 nm de diámetro), se pueden usar para etiquetar diferentes objetos de estudio de ADN hibridados para la misma matriz.

15 Las nanopartículas útiles en la práctica de la invención incluyen materiales coloidales de metal (por ejemplo, oro, plata, cobre y platino), semiconductores (por ejemplo, CdSe, CdS y CdS o CdSe recubierto con ZnS) y magnéticos (por ej., ferromagnetita). Los métodos para fabricar nanopartículas de metal, semiconductoras y magnéticas son conocidas en la técnica. Véase, por ej., Schmid, G. (ed.) Clusters and Colloids (VCH, Weinheim, 1.994); Hayat, M. A. (ed.) Colloidal Gold: Principles, Methods, and Applications (Academic Press, San Diego, 1.991); Massart, R., IEEE Transactions On Magnetism, 17, 1.247 (1.981); Ahmadi, T. S. et al., Science, 272, 1.924 (1.996); Henglein, A. et al., J. Phys. Chem., 99, 14.129 (1.995); Curtis, A. C. et al., Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 27, 1.530 (1.988). Otras nanopartículas útiles en la práctica de la invención incluyen: ZnS, ZnO, TiO₂, AgI, AgBr, HgI₂, PbS, PbSe, ZnTe, CdTe, In₂S₃, In₂Se₃, Cd₃P₂, Cd₃As₂, InAs y GaAs. Véase, por ej., Welter, Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 32, 41 (1.993); Henglein, Top. Curr. Chem., 143, 113 (1.988); Henglein, Chem. Rev., 89, 1.861 (1.989); Brus, Appl. Phys. A., 53, 465 (1.991); Bahncmann, en Photochemical Conversion and Storage of Solar Energy (eds. Pelizzetti and Schiavello 1.991), página 251; Wang and Herron, J. Phys. Chem., 95, 525 (1.991); Olshavsky et al., J. Am. Chem. Soc., 112, 9.438 (1.990); Ushida et al., J. Phys. Chem., 95, 5.382 (1.992). Nanopartículas de oro adecuadas también están comercialmente disponibles en, por ej., Ted Pella, Inc., Amersham Corporation and Nanoprobes, Inc.

20 Hay métodos para controlar el crecimiento de nanopartículas. La patente de EE.UU. 7.033.415 para Mirkin et al. describe nuevos tipos de mecanismos de crecimiento conducidos por plasmones para nanoestructuras de plata que implican la fusión de nanoprismas triangulares. Este mecanismo, que es conducido por excitación de plasmones y muy cooperativo, produce distribuciones de tamaño de partícula bimodal. En estos métodos, el proceso de crecimiento se puede cambiar de manera selectiva entre distribuciones bimodal y unimodal usando iluminación de doble haz de las nanopartículas. Este tipo de fotocontrol cooperativo sobre el crecimiento de nanoestructuras permite la síntesis de nanoprismas monodispersos con una longitud de borde preseleccionada en el intervalo de 30-120 nm simplemente usando un haz para abandonar el crecimiento bimodal y el otro (variado por el intervalo 450-700 nm) para controlar el tamaño de la partícula. Aunque se considera una variedad de tamaños, el tamaño de las nanopartículas es preferiblemente de aproximadamente 5 nm a aproximadamente 150 nm (diámetro medio), más preferiblemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 50 nm, lo más preferiblemente de aproximadamente 10 a aproximadamente 30 nm. Las nanopartículas también pueden ser varillas.

25 En el momento presente se prefieren para uso en la detección de ácidos nucleicos nanopartículas de oro. Véase la Patente de EE.UU. N° 7.169.556. Las partículas coloidales de oro presentan altos coeficientes de extinción para las bandas que dan lugar a sus bonitos colores. Estos colores intensos cambian con el tamaño de partícula, la concentración, la distancia interpartículas y la extensión de la agregación y forma (geometría) de los agregados, haciendo estos materiales particularmente atractivos para ensayos colorimétricos. Por ejemplo, la hibridación de oligonucleótidos unidos a nanopartículas con oligonucleótidos y ácidos nucleicos da como resultado un cambio de color intermedio visible a simple vista.

30 También se prefieren actualmente nanopartículas de oro para uso en nanofabricación por las mismas razones dadas anteriormente y debido a su estabilidad, facilidad de formación de imágenes por microscopía electrónica y modificación bien caracterizada con funcionalidades tiol. También se prefieren para uso en nanofabricación nanopartículas semiconductoras debido a sus propiedades electrónicas y luminiscentes únicas.

Alternativamente, en una realización, la presente invención considera el uso de nanocristales como agentes de formación de imágenes y/o agentes codificadores (es decir, agentes que permiten la detección y/o identificación de compuestos, incluyendo biomoléculas, introducidas en las matrices) así como sustancias que se tienen que transferir

en los sitios de las matrices. En algunas realizaciones, la detección de moléculas solas dentro de una matriz mejora por el uso de nanocristales. En una realización, los nanocristales están adheridos o unidos al analito objeto de estudio. En otra realización, los nanocristales están adheridos a una pareja de unión, uniéndose la pareja de unión a su vez al analito objeto de estudio. En una realización más, los nanocristales están adheridos a un inhibidor, un sustrato u otro ligando. En otras realizaciones, los nanocristales se usan con técnicas sensibles de fibra óptica. En algunas realizaciones de la presente invención, los módulos de formación de imagen comprenden modificaciones de superficie de puntos cuánticos (Véase por ej., Chan y Nie, *Science* 281: 2.016 (1.998)) tales como seleniuro de cadmio taponado con sulfuro de zinc acoplado a biomoléculas (Sooklal, *Adv. Mater.*, 10: 1.083 (1.998)).

Los términos "nanocristal semiconductor", "punto cuántico" y "nanocristal Qdot.TM", se usan indistintamente en la presente memoria y se refieren a un cristalito inorgánico entre aproximadamente 1 nm y aproximadamente 1.000 nm en diámetro o cualquier número entero o fracción de un número entero en medio, preferiblemente entre aproximadamente 2 nm y aproximadamente 50 nm o cualquier número entero o fracción de número entero en medio, más preferiblemente aproximadamente 2 nm a aproximadamente 20 nm (tales como aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ó 20 nm). Un nanocristal semiconductor es capaz de emitir radiación electromagnética en la excitación (es decir, el nanocristal semiconductor es luminiscente) e incluye un "centro" de uno o más primeros materiales semiconductores y puede estar rodeado por una "carcasa" de un segundo material semiconductor. Un centro de nanocristal semiconductor rodeado por una carcasa semiconductor se refiere como un nanocristal semiconductor de "centro/carcasa". El material de la "carcasa" circundante tendrá preferiblemente una energía de banda prohibida que es mayor que la energía de banda prohibida del material de centro y se puede elegir que tenga un espaciado atómico próximo al del sustrato de "centro". El centro y/o la carcasa puede ser un material semiconductor incluyendo, pero no limitado a, los materiales del grupo II-VI (ZnS, ZnSe, ZnTe, CdS, CdSe, CdTe, HgS, HgSe, HgTe, MgS, MgSe, MgTe, CaS, CaSe, CaTe, SrS, SrSe, SrTe, BaS, BaSe, BaTe y similares) y III-V (GaN, GaP, GaAs, GaSb, InN, InP, InAs, InSb y similares) y IV (Ge, Si y similares) y una aleación o una mezcla de los mismos.

Un nanocristal semiconductor está, opcionalmente, rodeado por un "recubrimiento" de un agente de taponamiento orgánico. El agente de taponamiento orgánico puede ser cualquier número de materiales, pero presenta una afinidad por la superficie del nanocristal semiconductor. En general, el agente de taponamiento puede ser una molécula orgánica aislada, un polímero (o un monómero para una reacción de polimerización), un complejo inorgánico y una estructura cristalina extendida. El recubrimiento se usa para llevar solubilidad, por ejemplo, la capacidad para dispersar un nanocristal semiconductor recubierto de manera homogénea en un disolvente elegido, funcionalidad, propiedades de unión o similares. Por ejemplo, se pueden introducir propiedades de unión de manera que el nanocristal o los nanocristales se unan al analito objeto de estudio de elección. Además, el recubrimiento se puede usar para diseñar las propiedades ópticas del nanocristal semiconductor. Métodos para producir nanocristales semiconductores taponados se discuten en la Patente de EE.UU. N° 6.274.323.

En otras realizaciones más, la detección de moléculas solas dentro de una matriz se mejora por el uso de dendrímeros. En una realización, los dendrímeros están adheridos o unidos al analito objeto de estudio. En otra realización, los dendrímeros están adheridos a una pareja de unión, uniéndose la pareja de unión a su vez al analito objeto de estudio. En una realización más, los dendrímeros están adheridos a un inhibidor, un sustrato u otro ligando. En otras realizaciones, se usan dendrímeros con técnicas sensibles de fibra óptica (Véase, por ej. Ye et al., *Solicitud de Patente de EE.UU. N° 20040131322*, *Solicitud de Patente Internacional PCT N° WO/2004057386* y *Thomas et al., Biophysical Journal*, 86 (6), 3.959 (2.004)).

Se han descrito de manera extensa polímeros dendrímeros (Véase, Tomalia, *Advanced Materials* 6: 529 (1.994); *Angew, Chem. Int. Ed. Engl.*, 29: 138 (1.990)). Se sintetizan polímeros dendrímeros como estructuras esféricas definidas que oscilan típicamente de 1 a 20 nanómetros de diámetro. El peso molecular y el número de grupos terminales aumentan exponencialmente como una función de generación (el número de capas) del polímero. Se pueden sintetizar diferentes tipos de dendrímeros basándose en la estructura del centro que inicia el proceso de polimerización.

Las estructuras de centro dendrímeras dictan diversas características de la molécula tales como la forma total, densidad y funcionalidad de la superficie (Tomalia et al., *Chem. Int. Ed. Engl.*, 29: 5.305 (1.990)). Los dendrímeros esféricos pueden tener amonio como un centro iniciador trivalente o etilendiamina (EDA) como un centro iniciador tetravalente. Los dendrímeros con forma de varilla recientemente descritos (Yin et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 120: 2.678 (1.998)) usan centros lineales de polietilenimina de longitudes variables; cuanto más largo el centro, más larga la varilla. Las macromoléculas dendríticas están comercialmente disponibles en cantidades de kilogramo y son producidas en buenos procedimientos de fabricación (GMP, por sus siglas en inglés) actuales para aplicaciones de biotecnología.

Los dendrímeros se pueden caracterizar por una serie de técnicas incluyendo, pero no limitándose a, espectroscopía de masas de ionización por electropulverización, espectroscopía de resonancia magnética nuclear de ¹³C, espectroscopía de resonancia magnética nuclear de ¹H, cromatografía líquida de alta resolución, cromatografía de exclusión por tamaños con dispersión multiángulo de luz láser, espectrofotometría ultravioleta, electroforesis capilar y electroforesis de gel. Estos ensayos aseguran la uniformidad de la población de polímeros y son importantes para vigilar el control de calidad de la fabricación de dendrímeros para aplicaciones de GMP.

- 5 Numerosas Patentes de EE.UU. describen métodos y composiciones para producir dendrímeros. Ejemplos de algunas de estas patentes se proporcionan a continuación para proporcionar una descripción de algunas composiciones de dendrímeros que pueden ser útiles en la presente invención, sin embargo se debería entender que estos son simplemente ejemplos ilustrativos y se podían usar otras numerosas composiciones de dendrímeros similares en la presente invención.
- 10 La patente de EE.UU. N° 4.507.466, la patente de EE.UU. N° 4.558.120, la patente de EE.UU. N° 4.568.737 y la patente de EE.UU. N° 4.587.329 describen cada una métodos para preparar polímeros estrella densos con densidades terminales mayores que los polímeros estrella convencionales. Estos polímeros presentan reactividad mayor/más uniforme que los polímeros estrella convencionales, es decir, los polímeros estrella densos de 3ª generación. Estas patentes describen además la naturaleza de los dendrímeros de amidoamina y el diámetro molecular tridimensional de los dendrímeros.
- 15 La patente de EE.UU. N° 4.631.337 describe polímeros hidrolíticamente estables. La Patente de EE.UU. N° 4.694.064 describe dendrímeros con forma de varilla. La Patente de EE.UU. N° 4.713.975 describe polímeros de estrella densos y su uso para caracterizar superficies de virus, bacterias y proteínas incluyendo enzimas. Los polímeros de estrella densos de puente se describen en la Patente de EE.UU. N° 4.737.550, la patente de EE.UU. N° 4.857.599 y la Patente de EE.UU. N° 4.871.779 describen polímeros de estrella densos sobre centros inmovilizados útiles como resinas de intercambio iónico, resinas de quelación y métodos para preparar dichos polímeros.
- 20 La Patente de EE.UU. N° 5.338.532 se refiere a conjugados en cascada de dendrímero o dendrímeros conjuntamente con un producto farmacéutico u otro material. Esta patente describe el uso de dendrímeros para proporcionar medios de suministro de altas concentraciones de materiales transportados por polímero unidad, suministro controlado, suministro fijado como objetivo y/o múltiples especies tales como, por ej., fármacos, antibióticos, toxinas generales y específicas, iones metálicos, radionúclidos, generadores de señales, anticuerpos, interleucinas, hormonas, interferones, virus, fragmentos víricos, pesticidas y antimicrobianos.
- 25 La patente de EE.UU. N° 6.471.968 describe un complejo dendrímero que comprende dendrímeros primero y segundo ligados mediante enlaces covalentes, comprendiendo el primer dendrímero un primer agente y comprendiendo el segundo dendrímero un segundo agente, en el que el primer dendrímero es diferente del segundo dendrímero y donde el primer agente es diferente del segundo agente.
- 30 Otras composiciones de tipo dendrímero útiles se describen en la Patente de EE.UU. N° 5.387.617, la Patente de EE.UU. N° 5.393.797 y la patente de EE.UU. N° 5.393.795 en que se modifican polímeros estrella densos por taponamiento con un grupo hidrófobo capaz de proporcionar una carcasa externa hidrófoba. La Patente de EE.UU. N° 5.527.524 describe el uso de dendrímeros terminados en amino en conjugados de anticuerpo.
- 35 El uso de dendrímeros como portadores de iones metálicos se describe en la Patente de EE.UU. N° 5.560.929, la patente de EE.UU. N° 5.773.527 describe polímeros polirramificados no reticulados que tienen una configuración *comb-burst* y métodos para preparar los mismos. La Patente de EE.UU. N° 5.631.329 describe un procedimiento para producir polímero polirramificado de alto peso molecular formando una primera serie de polímeros ramificados protegidos de ramificación; injertando a un centro; desprotección del polímero ramificado de primera serie, formación después de una segunda serie de polímeros ramificados protegidos de ramificación e injertando al centro con la primera serie de polímeros ramificados, etc.
- 40 La Patente de EE.UU. N° 5.898.005 y la Patente de EE.UU. N° 5.861.319 describen ensayos de inmunounión específica para determinar la concentración de un analito. La Patente de EE.UU. N° 5.661.025 proporciona detalles de un sistema de suministro de polinucleótidos de autoensamblaje que comprende polimerización de dendrímero para ayudar en el suministro de nucleótidos al sitio objeto de estudio. Esta patente proporciona métodos para introducir un polinucleótido en una célula eucariota *in vitro* que comprende poner en contacto la célula con una composición que
- 45 comprende un polinucleótido y un polimerización de dendrímero acoplado mediante enlaces no covalentes al polinucleótido.
- 50 Se ha demostrado previamente que los conjugados de anticuerpo de dendrímero para uso en aplicaciones de diagnóstico *in vitro* (Singh et al., Clin. Chem., 40: 1.845 (1.994)), para la producción de construcciones dendrímero - anticuerpo. Los dendrímeros también han sido conjugados a fluorocromos o balizas moleculares y demuestran que entran en las células. Se pueden detectar después dentro de la célula de una manera compatible con el aparato sensible para evaluación de cambios fisiológicos dentro de las células (Baker et al., Anal. Chem. 69: 990 (1.997)). Finalmente, se han construido dendrímeros como copolímeros de bloque diferenciados donde las porciones externas de la molécula se pueden digerir con enzima o catálisis inducida por la luz (Urdea y Horn, Science 261: 534 (1.993)).
- 55 En una realización, la presente invención considera el uso de dendrímeros con agentes adheridos para la formación de imágenes, por ejemplo, agentes para la formación de imágenes tales como fluoróforos (por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína) o puntos cuánticos. La fluoresceína se adhiere fácilmente a la superficie del dendrímero mediante los derivados de isotiocianato, que se pueden adquirir de Molecular Probes, Inc. Así pues, la presente invención proporciona un dendrímero multifuncional para mejorar la detección de una molécula única.

VI. Usos ejemplares de la presente invención

El sistema y la matriz de la presente descripción presentan muchos usos. Por ejemplo, la matriz presenta aplicación para estudios de enzimología fundamental, así como mediciones de concentración digitales. Además, la matriz permite estudios con múltiples enzimas diferentes y extiende los límites de detección ultra-baja para proteínas y ADN objetos de estudio. Con la capacidad para vigilar de manera simultánea una matriz grande de recipientes de reacción, se puede usar enzimología de una sola molécula para resolver el comportamiento de la molécula enzimática individual (por ej., Koff y Kon) de señal cinética volumétrica.

Otro uso, por ejemplo, es la vigilancia medioambiental de bacterias o virus o ambos. Se puede poner en contacto una muestra medioambiental que contiene potencialmente ciertas bacterias, con una matriz de la presente invención. Para detectar la bacteria, se lisan las células bacterianas y se fija como objetivo una enzima bacteriana (o más de una enzima) para detección. Según una realización, las células se lisan previamente a ser añadidas a la matriz. Alternativamente, se capturan las células y tiene lugar una etapa de lisado en la matriz previamente a la detección. En una alternativa más, puede no ser necesaria la lisis si se fija como objetivo un marcador de superficie celular. Por ejemplo, se puede capturar la bacteria o virus de interés con un anticuerpo que sea específico para un marcador de superficie sobre el objeto de estudio y después se puede detectar la captura con un ensayo de tipo sándwich añadiendo un anticuerpo etiquetado con enzima que se une al objeto de estudio en otra posición.

Otro uso, por ejemplo, implica medir expresión de genes. Como se indicó anteriormente, en una realización, los analitos objeto de estudio son células y éstas se introducen en los sitios de la matriz en las condiciones tales que algunos sitios contengan células únicas. Esta es la primera etapa en la medición de expresión de genes, que se puede realizar si se desea en el nivel de célula completa detectando proteínas de superficie y proteínas secretadas. Alternativamente, las células se pueden lisar y la transcripción (u otros componentes) de las células estudiadas. En una realización, cada sitio contiene una o ninguna transcripción. En una realización, se comparan células normales y cancerígenas. En una realización, la variación célula a célula en la expresión de genes se puede estudiar examinando la expresión de genes al nivel de célula única.

Ejemplos

Ejemplo 1

En este ejemplo, se realiza un ensayo de unión de prueba de concepto usando amplificación de señal enzimática en una matriz de recipientes de reacción de tamaño especificado de femtolitro. Más específicamente, se realizan ensayos diversos para detectar cantidades variables de estreptavidina β -galactosidasa (S β G) en disolución usando una matriz biotinizada de la presente descripción y después la correlación entre el número de pozos con moléculas S β G capturadas y se examina la concentración de la S β G en la muestra.

En este ejemplo, se usa una matriz de fibra óptica atacada químicamente para crear una colección de recipientes de reacción de tamaño especificado de femtolitro, cada uno específicamente funcionalizado y capaz de capturar moléculas objeto de estudio etiquetadas con enzima. Se confinan moléculas enzimáticas únicas a recipientes de reacción individuales y se cataliza la producción de un número suficiente de moléculas producto fluorescentes para generar una señal positiva. A concentraciones de moléculas objeto de estudio bajas, sólo un porcentaje de los sitios de captura se une a una molécula objeto de estudio, permitiendo una lectura binaria de la concentración del objeto de estudio de la matriz de alta densidad.

Materiales

Las matrices de recipientes de reactor en este ejemplo se generan usando un ataque con ácido de la cara distal de una matriz de fibra óptica de 1 mm pulida, que consiste en 24.000 fibras ópticas de 4,5 μ m individuales. El material de la fibra del centro es sílice y el revestimiento alrededor de cada fibra que es sílice dopada con germanio, que ataca químicamente a una velocidad más lenta. Las fibras de 4,5 μ m son atacadas químicamente a una profundidad de 2,9 μ m, creando una matriz de recipientes de reactor, cada uno con un volumen de 46 fl (véase la Figura 1a).

Primero se modificaron las fibras con un aminopropilsilano ligado a las superficies tanto del centro como de revestimiento (véase la Figura 1b). Para evitar la adhesión de biotina al revestimiento, se pulieron las fibras aminosilanizadas durante 10 segundos con película de pulimento de 0,3 μ m, que retiró la capa de revestimiento aminosilanizada superior de la matriz de fibras (véase la Figura 1c). Después de pulir, se adhirió NHS-biotina a los grupos amino sobre las superficies de los pozos (véase la Figura 1d).

Métodos

Primero, se ensayó la eficacia del componente de captura. Para ensayar la eficacia de la biotilación del sustrato, se adhirió estreptavidina Alexa Fluor 568® directamente a los grupos biotina sobre las superficies de tanto una fibra pulida como una fibra no pulida, seguido por adquisición de imágenes de la superficie modificada (véase la FIG. 3). La FIG. 3 muestra la unión de Estreptavidina Alexa Fluor 568® a (a) una matriz de fibra óptica modificada con biotina no pulida y (b) una matriz de fibra óptica modificada con biotina pulida. Como se observa en la imagen (a), la unión de estreptavidina tuvo lugar en todas las superficies, en comparación con la imagen (b), donde la unión sólo tuvo

lugar sobre las superficies de los reactores de los micropozos. Así, la fibra no pulida muestra colorante por la matriz completa incluyendo la superficie de revestimiento, mientras la fibra pulida muestra colorante localizado sólo en las superficies de los pozos.

5 Con posterioridad a la modificación de la matriz, se incubaron las matrices de fibras biotiniladas durante 1 hora a temperatura ambiente en 150 μ l de tampón PBS que contenía cantidades variables de S β G. La concentración de S β G se eligió de manera que durante el tiempo de incubación, se uniera a cada pozo estadísticamente una molécula o ninguna molécula. Después se lavaron repetidamente las matrices en tampón PBS, para asegurar que se retiraba el objeto de estudio no ligado.

10 Para una lectura binaria de unión de S β G, se cargó la matriz de fibras y se aseguró sobre un sistema de microscopio vertical provisto de plataforma mecánica. Se introdujo una disolución de sustrato de β -galactosidasa, resorufina- β -D-galactopiranosido (RDG), en el extremo distal de la fibra que contenía los recipientes de reacción y se selló con posterioridad. Se selló el sustrato usando un tapón de elastómero de silicona de $2,54 \times 10^{-2}$ cm (0,01 pulgada) de espesor en medio entre un portaobjeto y la matriz de fibras mediante una plataforma mecánica situada debajo de la platina del microscopio. Esta plataforma aplicó una presión uniforme al material del tapón, por el haz completo, cerrando cada cámara de reacción y permitiendo la interrogación pozo a pozo de actividad enzimática, la β -galactosidasa hidroliza RDG para formar resorufina, que aumenta hasta una concentración localmente alta en cada recipiente de reacción sellado, generando una señal fluorescente detectable (Figura 4).

15 La FIG. 4 representa una porción de la matriz de fibras para cada experimento. Cada uno de los experimentos ensayó una muestra diferente con una concentración diferente de S β G. Las concentraciones para cada experimento fueron 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 el control.

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

25 También se realizaron dos experimentos de control para asegurar que la unión de enzima a la superficie de los reactores estaba basada exclusivamente en la interacción biotina - estreptavidina, y no en unión no específica a la superficie de vidrio. Un experimento de control consistió en una fibra no modificada, atacada químicamente, incubada con la disolución de objeto de estudio de S β G más concentrada (128 amol en 150 μ l). Se realizó el segundo experimento de control usando la fibra modificada incubada en una disolución de β -galactosidasa que carecía de estreptavidina (128 amol en 150 μ l). Ambos experimentos de control generaron un porcentaje de pozo activo insignificante (menor que 0,06%, frente a 0,2% para el experimento de 2,6 amol discutido anteriormente).

35 Resultados

La FIG. 5 representa una representación gráfica log-log de los moles de objeto de estudio 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 objeto de estudio en la representación gráfica log-log mostrada en la Fig. 5 sugiere que se puede usar un método de detección de lectura binaria para la detección de objetos de estudio reales tales como ADN y antígenos. Este método permite el análisis rápido y la información de concentración precisa vía lectura digital, al tiempo que se mantiene un procedimiento de ensayo sencillo.

40 También es interesante observar que el límite de detección más bajo (LOD, por sus siglas en inglés) para unir estreptavidina- β -galactosidasa (S β G) a una matriz de femtolitro biotinilada en este ejemplo fue 2,6 amoles (150 μ l de disolución 17 fM) usando un tiempo de incubación de objeto de estudio de 1 hora.

45 Ejemplo 2

En este ejemplo, se controlaron moléculas únicas de β -galactosidasa usando un haz de fibra óptica de 1 mm de diámetro con más de $2,0 \times 10^5$ reactores de micropozos de femtolitro, individualmente sellados. Por observación del aumento de los productos fluorescentes a partir de catálisis de molécula enzimática única por la matriz de recipientes de reacción y por aplicación de un análisis estadístico de Poisson, se obtuvo una lectura digital de concentración.

50 Materiales

Se adquirieron fibras ópticas de 4,5 μ m en haces de 1 mm en Illumina (San Diego, CA). Se obtuvo β -galactosidasa y Ru(bpi)₃Cl₂ de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Se adquirió resorufina-D- β -galactopiranosido de Molecular Probes (Eugene, OR). Se adquirió material de laminación de silicona de brillo no reforzado de $2,54 \times 10^{-2}$ cm (0,01 pulgada) en Specialty Manufacturing Inc. (Saginaw, MI). Todos los demás productos químicos usados fueron de calidad

reactivo y se obtuvieron en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

Un sistema de formación de imágenes de epifluorescencia vertical, fabricado a medida, adquirió todas las imágenes de fluorescencia usando una fuente de luz de mercurio, ruedas de filtro de excitación y emisión, objetivos de microscopio y una cámara CCD (QE, Sensicam). Las ruedas de filtro y los obturadores fueron controlados por ordenador y se realizó el análisis con el programa informático IPlab (Scanalytics, Fairfax, VA). El sistema estaba provisto de dispositivo de fijación para fijar la matriz de fibra óptica sobre el sistema por el experimento entero. Se usó una plataforma mecánica debajo de la platina para alojar la capa de sellado de silicona, que con posterioridad se puso en contacto con el extremo distal de la matriz de fibras, cerrando cada recipiente de reacción. Todas las mediciones se realizaron con matrices de femtopozos en el extremo distal del haz de fibras ópticas.

Se usaron haces de fibra óptica que contenían aproximadamente $2,4 \times 10^5$ fibras ópticas de $4,5 \mu\text{m}$ de diámetro, individuales, como el sustrato para fabricar matrices de recipientes de reacción de femtolitro. El volumen del pozo se puede controlar con precisión, ya que la profundidad del ataque varía con el tiempo de ataque y la concentración de atacante. Las fibras ópticas usadas en estos experimentos se atacaron químicamente a una profundidad de aproximadamente $2,9 \mu\text{m}$, proporcionando un volumen de pozo de 46 fl. La FIG. 6 representa imágenes de la superficie atacada de los haces de fibra óptica. Más específicamente, la FIG. 6a representa la matriz de fibras completa y las imágenes de microscopio de cerca del haz de fibras, enfatizando la regularidad de tanto la matriz como cada fibra óptica individual. Además, la FIG. 6b es una imagen AFM de una porción de la superficie atacada químicamente, que muestra los pozos creados del procedimiento de ataque químico.

Métodos

Ensayo. Para el ensayo de β -galactosidasa, el sustrato usado fue resorufina- β -D-galactopiranosido. Después de que se sellaran los pozos individuales en la matriz en presencia de enzima y sustrato, se controló la intensidad de la fluorescencia por la matriz de recipientes por el producto enzimático, resorufina (ex 558 nm / em 573 nm). Se preparó una disolución 100 μM de resorufina-D- β -galactopiranosido (RDG) en tampón Tris 100 mM pH 8,0 que contenía KCl 2,0 mM y MgCl_2 0,1 mM. Todas las disoluciones de enzima se prepararon a partir de muestras patrón hechas alícuotas y congeladas previamente en el mismo tampón de reacción. Justo antes de experimentación, se centrifugaron las dos muestras durante 2 minutos a 733 rad/s (7.000 rpm) para retirar todo material particulado que pudiera interferir con la mecánica del cierre de silicona. Se limpió aproximadamente 1 cm^2 de silicona y un portaobjetos con etanol absoluto. Se puso la lámina de silicona sobre la superficie del vidrio, a la que se adhirió. Con posterioridad, se mezclaron volúmenes de 75 μl de enzima y disoluciones RDG sobre el tapón de silicona usando una pipeta. El tapón se elevó mecánicamente hacia el extremo distal del haz de fibras hasta que experimentó resistencia, que sugirió que se formó un cierre. Se adquirió una imagen de fluorescencia inicial, seguido por adquisición periódica de imágenes durante aproximadamente 2 h.

Componente de sellado. Para sellar la matriz de femtolitro, se puso un tapón de elastómero de silicona de $2,54 \times 10^{-2}$ cm (0,01 pulgada) de espesor en medio entre un portaobjeto y la matriz de fibras usando una plataforma mecánica. Esta plataforma aplicó una presión uniforme al material del tapón, por el haz completo, cerrando cada micropozo para crear los recipientes de reacción.

El cierre de silicona/vidrio usado para crear y aislar los envases de femtolitro se inspeccionó por su capacidad de sellado realizando un experimento de fotoblanqueo (véase la Fig. 7). La FIG. 7 representa el cierre de una disolución en las microcámaras y la evaluación de la integridad del cierre de silicona. La Fig. 7a representa una disolución de $\text{Ru}(\text{bpi})_3\text{Cl}_2$ encerrado en la matriz de cámaras como se observa por la fluorescencia roja a través de la matriz. La Fig. 7b representa una porción octagonal pequeña del haz de fibras que fue fotoblanqueado por luz ultravioleta. La Fig. 7c representa la matriz 60 minutos más tarde. Como se muestra en la figura, la difusión de $\text{Ru}(\text{bpi})_3\text{Cl}_2$ de un pozo a otro como resultado de un cierre de silicona imperfecto mostraría intensidad de fluorescencia aumentada en pozos fotoblanqueados y no se observó. Este experimento corroboró la integridad del cierre por su capacidad para aislar con éxito la matriz de los recipientes. La desnaturalización de la molécula de enzima sobre la superficie de vidrio se evitó por bloqueo con un tampón de bloqueo de BSA. Las relaciones enzima a recipiente usadas oscilaron de 1: 5, hasta 1: 500, consiguiendo detección precisa por dos órdenes de magnitud.

Experimento de fotoblanqueo. Se usó una disolución de $\text{Ru}(\text{bpi})_3\text{Cl}_2$ 1 mM en agua DI para los experimentos de fotoblanqueo. Se limpió un trozo de silicona, aproximadamente 1 cm^2 , y un portaobjetos con etanol absoluto usando hisopos sin pelusa. Se puso la lámina de silicona sobre la superficie del vidrio, a la que se adhirió. Se pusieron 50 μl de la disolución de $\text{Ru}(\text{bpi})_3\text{Cl}_2$ sobre la silicona y con posterioridad se puso en contacto con el haz de fibras para encerrar la disolución de los recipientes individuales. Usando un diafragma de campo sobre el sistema de formación de imágenes, se usó luz ultravioleta para iluminar una pequeña porción de la matriz durante 10 minutos, fotoblanqueando el $\text{Ru}(\text{bpi})_3\text{Cl}_2$. Se abrió después el diafragma de campo y se adquirió una imagen, mostrando la diferencia de fluorescencia. Después se permitió que reposara la matriz con el cierre mantenido. Se tomó una imagen final después de 60 min, confirmando la integridad del cierre.

Como se discutió anteriormente, el número y el volumen de recipientes de reacción empleados gobernó el intervalo dinámico de concentraciones que se puede determinar por esta técnica. Los volúmenes de los recipientes de reacción empleados en este ejemplo fueron 46 fl (véase más adelante); por lo tanto, se calculó que una disolución

de β -galactosidasa $3,6 \times 10^{-11}$ M proporciona, de promedio, una molécula de enzima por recipiente. Como se discutió anteriormente también, si las concentraciones usadas son mucho menores que $3,6 \times 10^{-11}$ M, el promedio esperado se hace excepcionalmente bajo, la distribución se estrecha y la probabilidad de observar cualquier otro caso distinto de 0 o 1 por prueba es improbable en todos los casos experimentales. A estas bajas concentraciones, la relación entre el porcentaje de recipientes de reacción activos y la concentración enzimática volumétrica es aproximadamente lineal. Después de esperar durante un tiempo suficiente para permitir que tenga lugar la catálisis enzimática, se interrogaron los recipientes individuales para una respuesta de encendido/apagado, correlacionándose cada recipiente cada recipiente con que posee o que carece de actividad enzimática.

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

Resultados

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

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 en la tabla, las mediciones de la matriz se correlacionaron con éxito con el número de moléculas de β -galactosidasa enzimáticas únicas por el intervalo completo de concentraciones interrogadas. Hay una disparidad minoritaria en las señales observadas como resultado de variación molécula a molécula en actividad catalítica. Este resultado es lo más probablemente debido a la naturaleza estocástica inherente de las enzimas, además de los efectos de superficie, dando como resultado modulación de actividad enzimática.

Lectura digital de concentraciones enzimáticas

Relación enzima a pozo	Concentración	% Poisson de pozos activos	% real activo
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 matrices. El porcentaje real de las cámaras que presentan actividad, en comparación con el porcentaje esperado calculado de la distribución de Poisson, se enumera para las diversas concentraciones analizadas.

La variación entre los resultados calculados y experimentales se puede atribuir a la variabilidad intrínseca asociada a la distribución de probabilidad, así como al error experimental en la preparación de disoluciones de enzima.

Ejemplo 3

En este ejemplo se estudió beta-galactosidasa en presencia de un inhibidor competitivo, D-galactal (un análogo de estado de transición de D-galactosa) como un par enzima - inhibidor de modelo. El alcance de esta solicitud no estará limitado, sin embargo, a este par enzima - inhibidor particular. La beta-galactosidasa es un tetrámero y se sabe que D-galactal presenta unión y liberación relativamente lenta. La Figura 9 muestra una realización del esquema para medir la inhibición de una sola molécula, así como la detección de inhibidor. En una primera etapa, la enzima y el inhibidor se preincubaban en un sistema de tampón acuoso tal como un tampón de fosfato (en esta realización particular tampón PBS/MgCl₂: KCl 2,7 mM, KH₂PO₄, KH₂PO₄ 1,5 mM, NaCl 136 mM,

Na₂HPO₄ 8,1 mM, MgCl₂ 1 mM, pH 7,3) junto en masa, de manera que la concentración de inhibidor ([inhibidor]) es mayor que la constante de disociación para la unión de inhibidor (K_i) y todo de los sitios activos de la enzima probablemente se tiene que bloquear u ocupar. Como cada K_i difiere para pares enzima/inhibidor diferentes, se debe ajustar la concentración de inhibidor. Con este par de enzima/inhibidor particular usado en este ejemplo se puede emplear una variedad de concentraciones de partida de inhibidor, oscilando entre 100 mM y 20 μM. En esta realización, la [inhibidor] fue 100 μM (~7 x K_i (14 μM)). En una segunda etapa, uno o más sustratos (por ejemplo, resorufina-beta-galactopiranosido RGP) en un sistema tampón acuoso (en esta realización particular: tampón PBS/MgCl₂), preferiblemente en un exceso de volumen alto (entre 10 veces y 100.000 veces). En esta realización particular, se usó un exceso de volumen de 1.000 veces, diluyendo de ese modo el inhibidor y la enzima 1.000 veces. Se pueden añadir más componentes (en esta realización particular albúmina de suero bovino al 1% (p/v) (BSA) para evitar la unión no específica a la superficie de las matrices de los sitios) al sistema tampón. En una tercera etapa, se añade la disolución volumétrica a la matriz de los sitios, teniendo cada sitio un volumen definido (entre 10 attolitros y 50 picolitros, más preferiblemente femtolitros, en esta realización: 46 femtolitros). En este punto, el inhibidor no está más en exceso; por supuesto, [inhibidor] << K_i (se prefiere que queden en la disolución menos de 100.000 moléculas de inhibidor y preferiblemente menos de 10.000 moléculas de inhibidor e incluso más preferiblemente menos de 3.000 moléculas de inhibidor). La concentración de enzimas (1,8 nM) se ajusta de manera que en la dilución de 1.000 veces en la etapa 2 sólo haya una única enzima en cada sitio de la matriz en algunos sitios y no haya enzima en otros. La Figura 9 muestra esquemáticamente la situación en que uno de los sitios activos del tetrámero no esté bloqueado y esté activo. Este sitio activo podría interactuar con un sustrato que incluya un resto informador. Este dominio puede crear una señal cromogénica o una fluorogénica en la escisión enzimática pero no está limitada a éstas. Preferiblemente se genera una señal fluorogénica y más preferiblemente se usa RGP como el sustrato fluorogénico. De esta manera el sitio en la matriz con dicha actividad se puede detectar fácilmente (Figura 10).

En una realización, la presente invención considera determinar recambio de sustrato en diferentes puntos (por ejemplo, intervalos de segundos, decenas de segundos, centenas de segundos, minutos, decenas de minutos, etc.). La Figura 11 muestra que cuando se ensaya según el esquema de las Figuras 9 y 10, la presencia de un inhibidor retarda el recambio de sustrato, cuando se compara con un control (panel izquierdo inferior) donde no hay inhibidor. Cuando la distribución de frecuencia de los tiempos de comienzo de recambio de sustrato se representa gráficamente (Figura 12), se puede calcular la constante de velocidad K_{apagado}: 4,6 x 10⁻³ s. Esto está de acuerdo con los valores publicados.

Curiosamente, los datos sugieren que la liberación de inhibidor en cada uno de los cuatro sitios de tetrámero no es independiente. Es decir, si hay 4 sitios catalíticos independientes de un tetrámero y K_{apagado} es una constante de velocidad de primer orden entonces K_{apagado} de un conjunto enzimático es la misma que K_{apagado} de cada protómero. Pero como cada enzima única contiene 4 protómeros hay 4 posibilidades para liberar un primer inhibidor. Por lo tanto: k_{apagado1} = 4 x K_{apagado} (= 1,8 x 10⁻² s⁻¹). Los datos sugieren que la liberación de inhibidor de los protómeros no es independiente.

En una segunda realización sin preincubación se proporciona el inhibidor a la enzima en un sistema tampón acuoso tal como un tampón de fosfato (en esta realización particular tampón PBS/MgCl₂. Se pueden añadir más componentes (en esta realización particular al 1% (p/v) (BSA) para evitar la unión no específica a la superficie de las matrices de los sitios) al sistema tampón. La [inhibidor] se elige en el mismo intervalo que K_i (14 μM), preferiblemente entre 100 mM y 1 μM, en esta realización 20 μM. A esta concentración de inhibidor, la enzima ligada a inhibidor está en equilibrio con la enzima sin inhibidor. La disolución volumétrica se añade a la matriz de sitios, teniendo cada sitio un volumen definido (entre 10 attolitros y 50 picolitros, más preferiblemente femtolitros, en esta realización: 46 femtolitros). La concentración de enzimas (1,8 pM) se elige para proporcionar sólo una enzima única en algunos sitios y ninguna enzima en otros sitios. Cuando se controla la fluorescencia con el tiempo, se puede observar unión, liberación y posterior unión (Figura 13). La Figura 13A (panel izquierdo) representa los datos brutos de diversas trazas de tiempo. La Figura 13B (el panel derecho) muestra simplemente una de las trazas de tiempo del panel izquierdo, donde por claridad, el eje y se escala de manera diferente. La Figura 13B muestra que la señal aumenta después de que el inhibidor ha sido liberado de la enzima y disminuye después de que se ha ligado el inhibidor. Se debería esperar que la señal de fluorescencia permanezca constante con el tiempo si el inhibidor está ligado a la enzima ya que no hay actividad enzimática. Pero este no es el caso debido a que hay una cantidad sustancial de fotoblanqueamiento que disminuye el fluoróforo de manera continua. Esto crea una dinámica con los resultados netos (con el tiempo) mostrados en la Figura 13.

La Figura 14 muestra un histograma de tiempos de apagado (cuánto tiempo el inhibidor permanece sobre la enzima antes de que se libere. Esto permite un cálculo de la semivida (la semivida de una cantidad sometida a descomposición exponencial es el tiempo requerido para que se descomponga la cantidad a la mitad de su valor inicial) que se determina experimentalmente que es aproximadamente dos minutos y treinta segundos. Este ejemplo demuestra que un sistema que mide enzimas únicas puede revelar más datos cinéticos acerca de cómo las subunidades enzimáticas interactúan que los que estuvieron previamente disponibles de las reacciones conjuntas.

Ejemplo 4

En una realización, se utilizan nanopartículas para la lectura digital de concentraciones objeto de estudio. Las

nanopartículas presentan diversas ventajas por una lectura digital de enzimas. Con una propuesta enzimática, a medida que aumentan las concentraciones, se pierde la linealidad de la lectura digital, que sigue una distribución de Poisson. Usando nanopartículas funcionalizadas con especies fluorescentes, la presente invención considera en una realización que puede realizar una lectura digital así como la lectura de intensidad volumétrica tradicional, que se usa extensamente en nuestro laboratorio. Como se pierde la linealidad de la señal digital, el análisis se puede desplazar de una lectura digital a una lectura de intensidad tradicional usando las nanopartículas. La señal se puede leer después como una intensidad promedio de cada sitio en la matriz (por ejemplo, intensidad promedio del pozo) que se correlaciona con concentración y aumentará significativamente el intervalo de concentraciones que se puede leer con este sistema. En algunas realizaciones que emplean nanopartículas, no se sella la matriz.

10 Nanopartículas tales como partículas de oro (por ejemplo, partículas de oro entre 1 y 500 nanómetros y más preferiblemente entre 50 y 250 nanómetros e incluso más preferiblemente entre 80-150 nanómetros) se pueden unir al analito objeto de estudio o un ligando que se unirá a un analito objeto de estudio. Se considera una variedad de realizaciones, incluyendo pero no limitándose a, realizaciones en que se une el objeto de estudio a la partícula de oro y se introduce en una matriz, comprendiendo dicha matriz una pareja de unión (por ejemplo, ligando inmovilizado). En otra realización, el analito objeto de estudio se puede adherir o de otro modo inmovilizar sobre la matriz y se puede introducir el conjugado de la pareja de unión de la partícula de oro a la matriz para unirse al analito objeto de estudio. En otra realización, un primer ligando de unión puede inmovilizar el objeto de estudio y se puede introducir el segundo ligando de unión de la partícula de oro en la matriz para unirse al objeto de estudio. Estas realizaciones se ilustran de manera esquemática en las Figuras 15 y 16, donde el objeto de estudio es ácido nucleico y las parejas de unión son sondas complementarias. En la Figura 15, la sonda 1 o la sonda 2 se pueden reemplazar con objeto de estudio, si se desea. En la Figura 16 se muestra un formato de sándwich de dos etapas, donde el objeto de estudio puede estar no etiquetado y ser incubado primero con sonda 1; después, se introduce la nanopartícula con sonda 2. Se puede considerar que el objeto de estudio opera como un ligador en esta realización.

En el presente ejemplo, el analito objeto de estudio es ácido nucleico, y las partículas de oro se etiquetan con una pluralidad (por ejemplo, aproximadamente 2.000 – 8.000 cadenas) de ADN fluorescente; este conjugado de ADN - partículas de oro se usará para generar señal. Debido al alto número de cadenas de ADN fluorescentes adheridas a cada nanopartícula, una sola partícula es suficiente para alcanzar el máximo de la señal sobre el fondo en un solo sitio (por ejemplo, micropozo) de la matriz (por ejemplo, la matriz de fibra óptica descrita anteriormente). La desviación de la intensidad de fluorescencia por una población de nanopartículas es muy pequeña en comparación con las enzimas, cuya velocidad catalítica es altamente fluctuante. Debido a esta alta tasa de fluctuación, sólo se puede descifrar una respuesta de sí o no, limitando el intervalo de detección para enzimas a aproximadamente dos órdenes de magnitud. Usar nanopartículas que presenten intensidades de señal equivalentes permitirá una lectura más controlada de 0 o 1 como se realiza con las enzimas, junto con lecturas de 2, 3, 4, etc. La capacidad para leer niveles de intensidad discretos permitirá un intervalo de detección superior, más allá de dos órdenes de magnitud. Las nanopartículas de oro funcionalizadas con analito (por ejemplo, conjugados de ADN-partículas de oro u otros conjugados de biomolécula - partícula de oro) mejorarán el límite de detección, ya que muestran de manera consistente niveles extremadamente bajos de unión no específica y reactiva cruzada en esquemas de detección de analito (por ejemplo, ADN).

A. Preparación de partículas de oro

40 Se pueden preparar partículas de oro de una serie de maneras (*Analytical Chemistry*, 2.000, 72, 5.535-5.541; *Science*, 2.002, 296, 1.836-1.838; *Science*, 2.002 295, 1.503-1.506; *J. Am. Chem. Soc.* 2.004, 126, 5.932-5.933). En un caso, se preparan coloides de oro (13 nm de diámetro) por reducción de HAuCl_4 con citrato como se describe en Frens, *Nature Phys. Sci.*, 241, 20 (1.973) y Grabar, *Anal Chem.*, 67, 735 (1.995). En resumen, se limpia todo el material de vidrio con agua regia (3 partes de HCl , 1 parte de HNO_3), se enjuaga con H_2O Nanopura, después se seca en estufa previamente a su uso. Se adquieren HAuCl_4 y citrato de sodio en Aldrich Chemical Company. Se lleva HAuCl_4 (1 mM, 500 ml) a reflujo con agitación. Después, se añade rápidamente citrato de sodio 38,8 mM (50 ml). El color de la disolución cambiará de amarillo pálido a color vino tinto y se debería continuar hirviendo a reflujo durante 15 min. Después de enfriar a temperatura ambiente, se puede filtrar la disolución roja por un filtro de 1 micrómetro Micron Separations Inc. Los coloides de Au se caracterizan fácilmente por espectroscopía UV-vis usando un espectrofotómetro de matriz de diodos Hewlett Packard 8452A y por Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM, por sus siglas en inglés) usando un microscopio electrónico de transmisión Hitachi 8100. Las partículas de oro con diámetros de 13 nm producirán un cambio de color visible cuando se agreguen con secuencias de oligonucleótidos objeto de estudio y de sondas en el intervalo de 10 a 35 nucleótidos.

B. Modificaciones de fibras

55 En este ejemplo, se emplea una matriz de fibras. La matriz de fibras pulida se ataca químicamente durante 115 segundos en HCl 0,025 M proporcionando pozos de 46 fl. Para limpiar, se incuban las fibras atacadas químicamente en agua Nanopura hirviendo durante 10 minutos.

Se puede modificar la superficie de la fibra atacada químicamente de una serie de maneras. En este ejemplo, se emplea una modificación de amina de la fibra. Primero, se prepara una disolución de silanización, es decir, una disolución al 1% de DETA (trimetoxisililpropildietilenoetriamina) en una disolución 95: 5 de etanol: agua nanopura.

Se incubó la fibra atacada químicamente en la disolución de silanización durante 20 minutos a temperatura ambiente, seguido por lavado con agua nanopura y secado en argón. Después se curó la fibra a 120 °C durante 15 minutos. En este punto, la fibra se modifica ahora con grupos amino.

5 Se puede hacer reaccionar una variedad de grupos funcionales con los grupos amino. En este ejemplo, el procedimiento implicó la modificación de maleimida de la fibra. Se disolvieron 3,55 mg de SMPB (4-[p-maleimidofenil]butirato de succinimidilo) en 1 ml de DMSO para crear una disolución patrón. Se preparó una disolución de reticulación: se añadieron 100 µl de esta disolución patrón a 900 µl de una disolución 90:10 de etanol:DMSO. Se incubaron las fibras silanizadas en la disolución de reticulación durante 2 horas a temperatura ambiente. Se lavó después la matriz con una disolución 80:20 de etanol: DMSO y se secó en argón. En este punto, 10 la fibra se modifica ahora con grupos maleimida.

C. Desprotección de ADN

Se reconstituyeron 2 nanomoles de ADN (protegido) modificado con tiol en 110 µl de PBS pH 7,4. Se añadieron 10 µl de patrón de DTT (ditiotreitilo) (1,0 M) a la disolución de ADN protegido y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente. Se usó una columna NAP-5 (GE Healthcare) para purificar el ADN desprotegido. Se equilibró la columna 15 con agua Nanopura.

Se añadió la disolución de 120 µl de tiol ADN desprotegido a la columna y se dejó que entrará completamente el gel. Se añadieron 380 µl de PBS 7,4 agua a la columna y se dejó que entrará completamente el gel. Se puso un tubo de recogida bajo la columna y se eluyó el tiol ADN por adición de 1,0 ml de PBS 7,4 agua a la columna. Se desecharon los primeros 400 µl y se recogió el ADN de 400 µl a 1 ml, como se describe en el protocolo de columna NAP-5 20 (proporcionado por el fabricante).

D. Adhesión de ADN

Se puede adherir directamente un ligando (en este caso, una sonda) específico para el analito objeto de estudio (en este caso, ácido nucleico) a los sitios de la matriz o a la nanopartícula (por ejemplo, partícula de oro) y después se puede introducir el conjugado (ADN - nanopartícula de oro) en la matriz. En este ejemplo, se incubaron las fibras 25 tratadas con maleimida en la disolución de ADN desprotegido con tiol (1 µM) durante 2 horas a temperatura ambiente. Se enjuagaron las fibras con PBS 7,4 para retirar ADN no ligado y se limpió con algodón la matriz para retirar sondas de ADN que estaban ligadas al material de revestimiento. Después se incubaron nanopartículas de oro (en este caso 80 nm) con la fibra y los experimentos preliminares mostraron unión con éxito (Figura 16).

Ejemplo 5

30 Este ejemplo describe la inmovilización de ADN monocatenario sintético sobre puntos cuánticos (QD) de nanopartículas semiconductores. Los QD del centro/carcasa de CdSe/ZnS naturales (-4 nm) son solubles sólo en medio orgánico, haciendo difícil la reacción directa con ADN monocatenario terminado en alquiltiol. Este problema se elude según Mirkin et al. taponando primero los QD con ácido 3-mercaptopropiónico. El grupo ácido carboxílico se desprotona después con 4-(dimetilamino)piridina, haciendo las partícula solubles en agua y facilitando la reacción de 35 los QD con secuencias de oligonucleótidos 3'-propiltiol- o 5'-hexiltiol-modificadas. Después de modificación de ADN, se separan las partículas de ADN no reaccionado por diálisis. Después se puede hibridar una cadena de ADN "ligador" a secuencias ligadas a superficie, generando conjuntos extendidos de nanopartículas. Los conjuntos QD se caracterizan fácilmente por TEM, espectroscopía UV/Visible y espectroscopia de fluorescencia. Supuestamente, se pueden ensamblar de manera reversible controlando la temperatura de la disolución. Como resultado, los conjuntos de QD y los agregados de material compuesto se pueden formar entre los QD y nanopartículas (por ej., 40 nanopartículas de oro de aproximadamente 13 nm).

Bibliografía

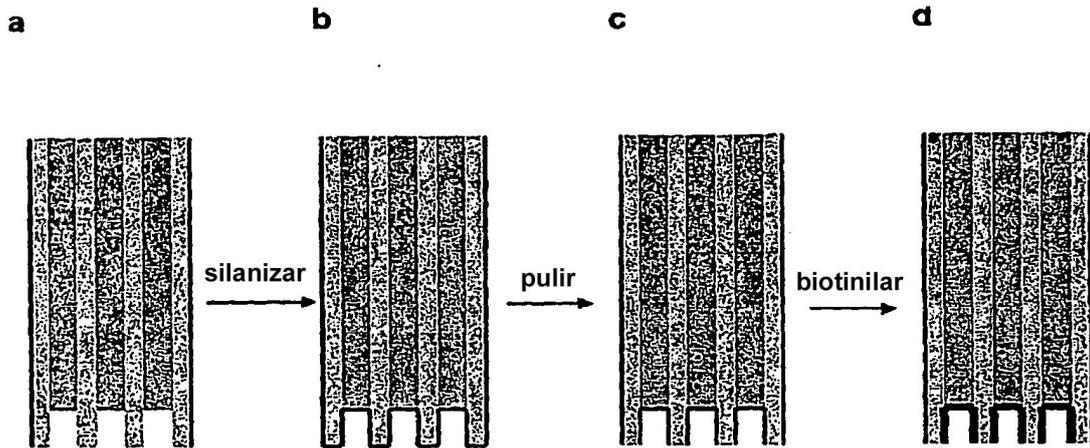
- Sano, T.; Smith, C. L.; Cantor, C. R. *Science* 1992, 258, 120-122.
- Nam, J. M.; Thaxton, C. S.; Mirkin, C. A. *Science* 2003, 301, 1884-1886.
- Niemeyer, C. M.; Adler, M.; Pignataro, B.; Lenhert, S.; Gao, S.; Chi, L. F.; Fuchs, H.; Blohm, D. *Nucleic Acids Research* 1999, 27, 4553-4561.
- Zhou, H.; 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.
- 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.
- 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.; Gaggari, A.; Modi, B. P.; Moscho, A.; Garza-Lopez, R. A.; Orwar, O.; Zare, R. N. *Science* 1999, 283, 1892-1895.
- Rissin, D. M.; Walt, D. R. *Journal of the American Chemical Society* submitted.
- 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.

- Foquet, M.; Koriach, J.; Zipfel, W. R.; Webb, W. W.; Craighead, H. G. *Analytical Chemistry* 2004, 76, 1618-1626.
- Gratzl, M.; Lu, H.; Matsumoto, T.; Yi, C.; Bright, G. R. *Analytical Chemistry* 1999, 71, 2751-2756.
- Stamou, D.; Duschl, C.; Delamarche, E.; Vogel, H. *Angewandte Chemie-International Edition* 2003, 42, 5580-5583.
- Gosalia, D. N.; Diamond, S. L. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 2003, 100, 8721-8726.
- Lu, H. P.; Xun, L. Y.; Xie, X. S. *Science* 1998, 282, 1877-1882.
- Taylor, J. R. *An Introduction to Error Analysis*; Second Addition ed.; University Science Books: Sausalito, CA, 1997.
- Wheeler, A. R.; Throdsset, W. R.; Whelan, R. J.; Leach, A. M.; Zare, R. N.; Liao, Y. H.; Farrell, K.; Manger, I. D.; Daridon, A. *Analytical Chemistry* 2003, 75, 3581-3586.

REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar y cuantificar un analito objeto de estudio que es una biomolécula en una muestra, comprendiendo el método:
 - 5 a) proporcionar una muestra y un sustrato, donde dicha muestra comprende un analito objeto de estudio que es una biomolécula, conteniendo dicho sustrato al menos 1.000 recipientes de reacción, teniendo cada recipiente de reacción un volumen definido de entre 10 attolitros y 50 picolitros;
 - b) poner en contacto el sustrato con la muestra de manera que los recipientes de reacción contengan el analito objeto de estudio que es una biomolécula ligado a los componentes de captura de manera que la relación de analito objeto de estudio que es una biomolécula para el número de recipientes de reacción es menor que 1:1; y
 - 10 c) determinar la fracción de los recipientes de reacción que contiene una biomolécula única.
2. El método de la reivindicación 1, que además comprende, después de la etapa b), sellar los recipientes de reacción de manera que los contenidos de cada recipiente de reacción no puedan escapar del recipiente de reacción.
- 15 3. El método de las reivindicaciones 1 o 2, en el que el analito objeto de estudio que es una biomolécula comprende dos o más tipos de analitos objeto de estudio.
4. El método de la reivindicación 1, en el que dicho analito objeto de estudio que es una biomolécula se selecciona del grupo que consiste en: proteínas, ácidos nucleicos, lípidos, carbohidratos, hormonas, citocinas, antígenos celulares, receptores y células.
- 20 5. El método de la reivindicación 1, que además comprende poner en contacto la pluralidad de recipientes de reacción con un ligando de unión que comprende un componente enzimático y, opcionalmente, poner en contacto además la pluralidad de recipientes de reacción con un sustrato enzimático.
6. El método de la reivindicación 1, que además comprende adherir o inmovilizar de otra manera nanopartículas respecto al analito objeto de estudio que es una biomolécula, opcionalmente donde las nanopartículas son nanopartículas de oro u, opcionalmente, donde cada una de las nanopartículas está funcionalizada con una especie fluorescente.
- 25 7. El método de la reivindicación 1, en el que dicho volumen definido se mide en femtolitros, opcionalmente, donde dicho volumen en femtolitros definido es el mismo en cada recipiente de reacción y está comprendido entre aproximadamente 30 femtolitros y aproximadamente 60 femtolitros.
- 30 8. El método la reivindicación 1, en el que la superficie modificada contiene: (i) de 1.000 a 5.000 recipientes de reacción; (ii) de 10.000 a 50.000 recipientes de reacción; o de 100.000 a 10.000.000 de recipientes de reacción.
9. El método de la reivindicación 1, en el que dicha determinación comprende detectar un cambio en una propiedad óptica en dichos recipientes de reacción como una indicación de la presencia de dicho analito objeto de estudio que es una biomolécula.
- 35 10. El método de la reivindicación 1, en el que dicho analito objeto de estudio que es una biomolécula está etiquetado.
11. El método de la reivindicación 1, en el que la fracción de recipientes de reacción que contienen un único analito objeto de estudio que es una biomolécula proporciona una medida de la concentración del analito objeto de estudio que es una biomolécula en dicha muestra.

FIG. 1



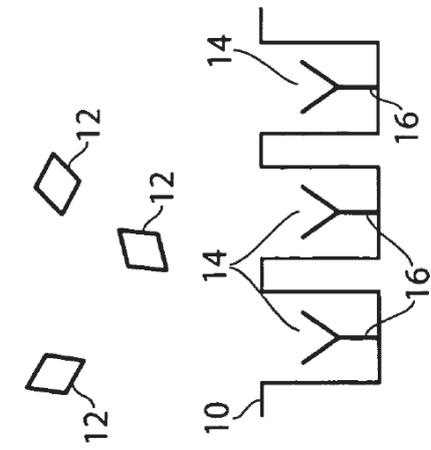


Fig. 2A

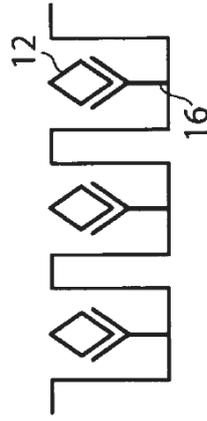


Fig. 2B

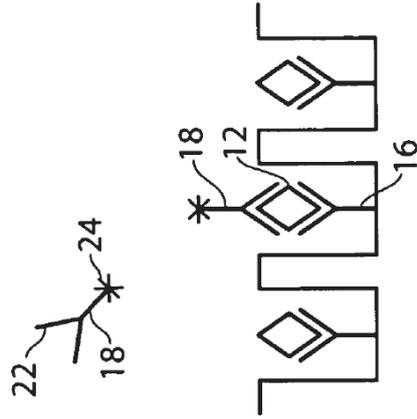
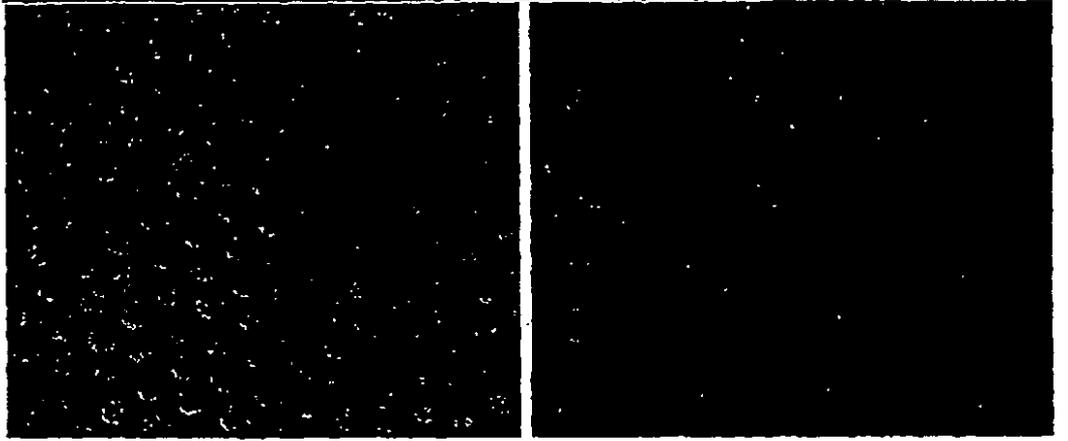


Fig. 2C

FIG. 3



(a)

(b)

FIG. 4

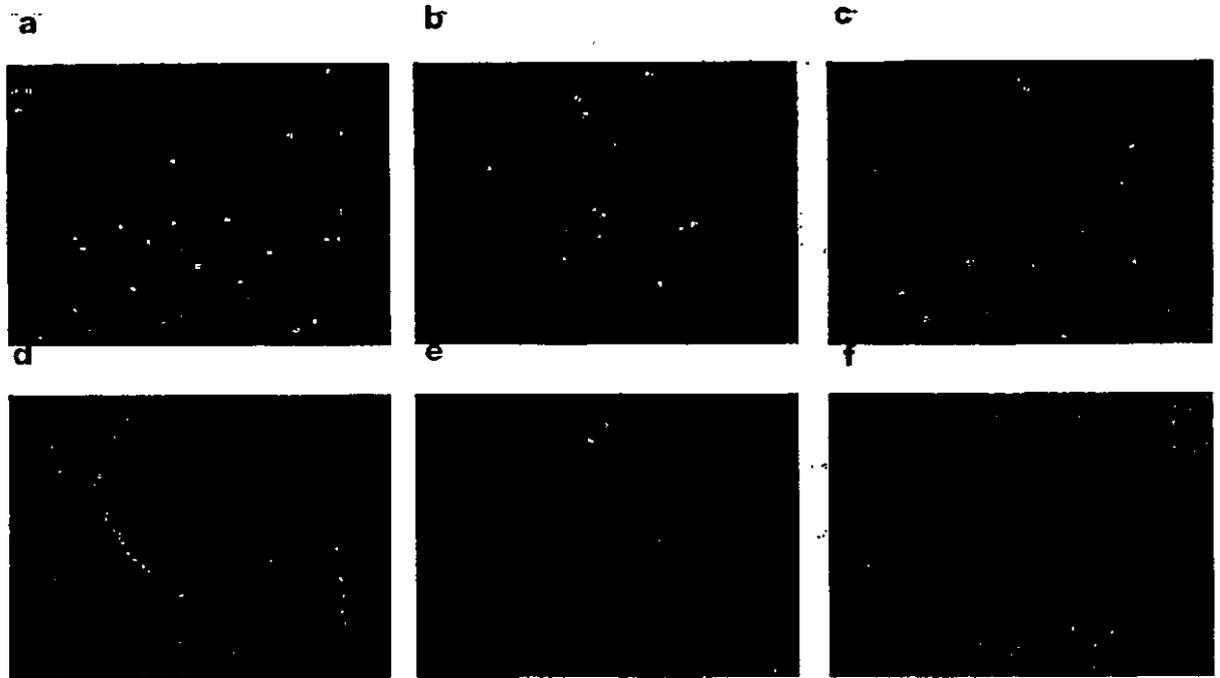


FIG. 5

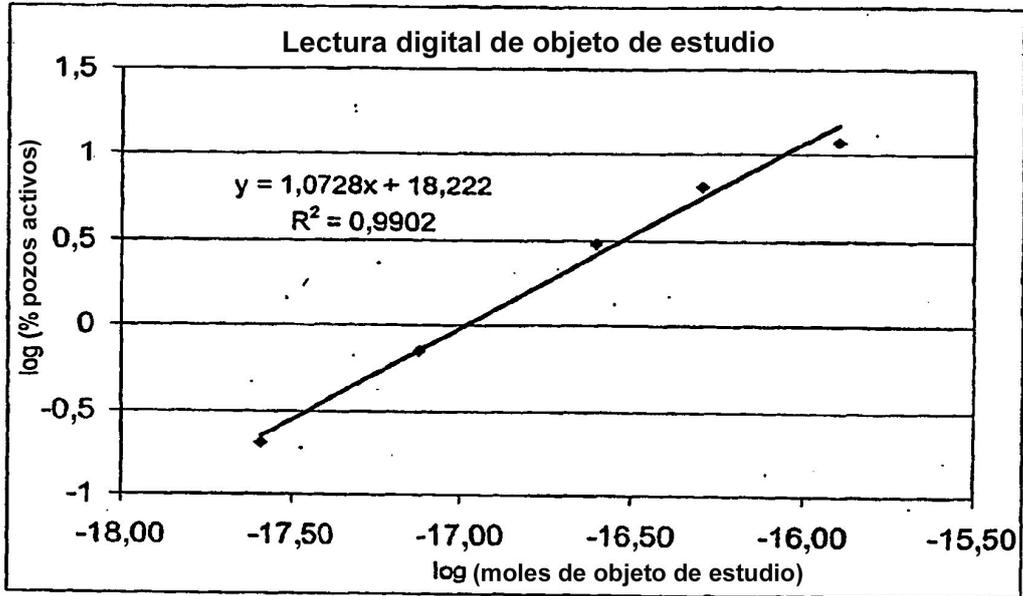
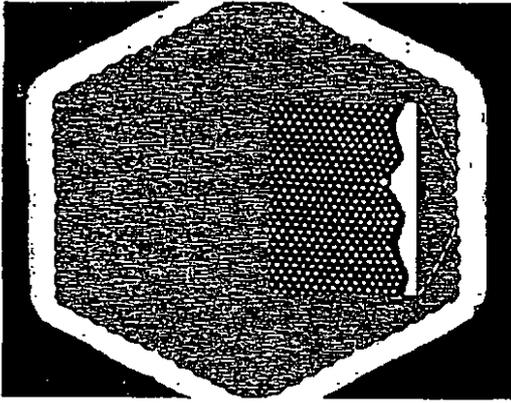
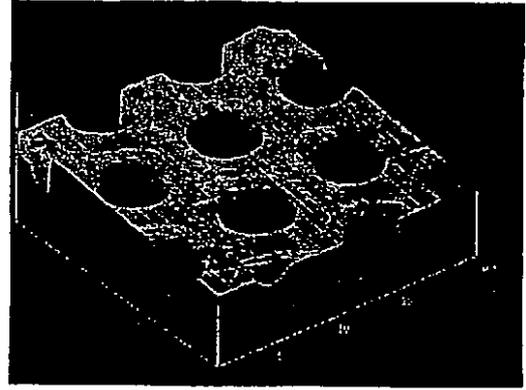


FIG. 6



(a)



(b)

FIG. 7

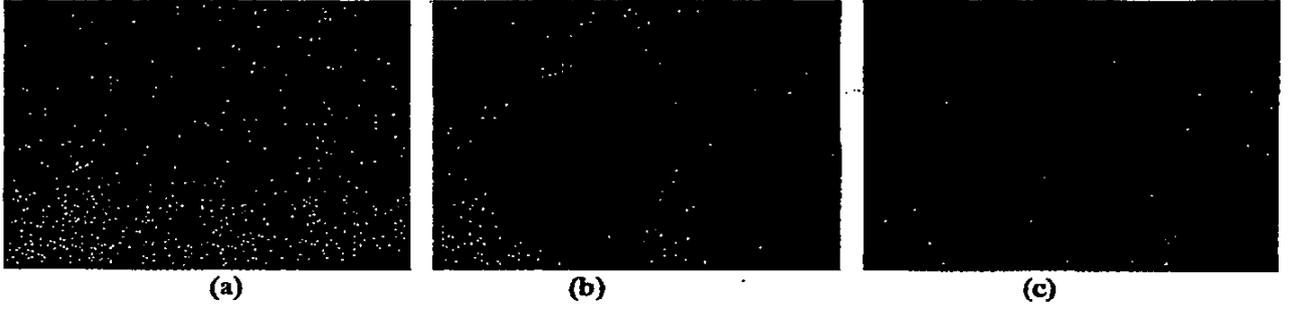
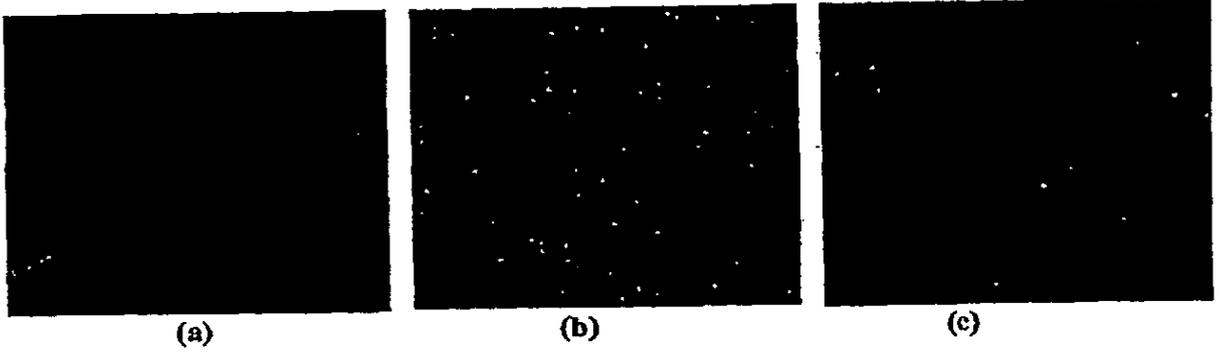


FIG. 8



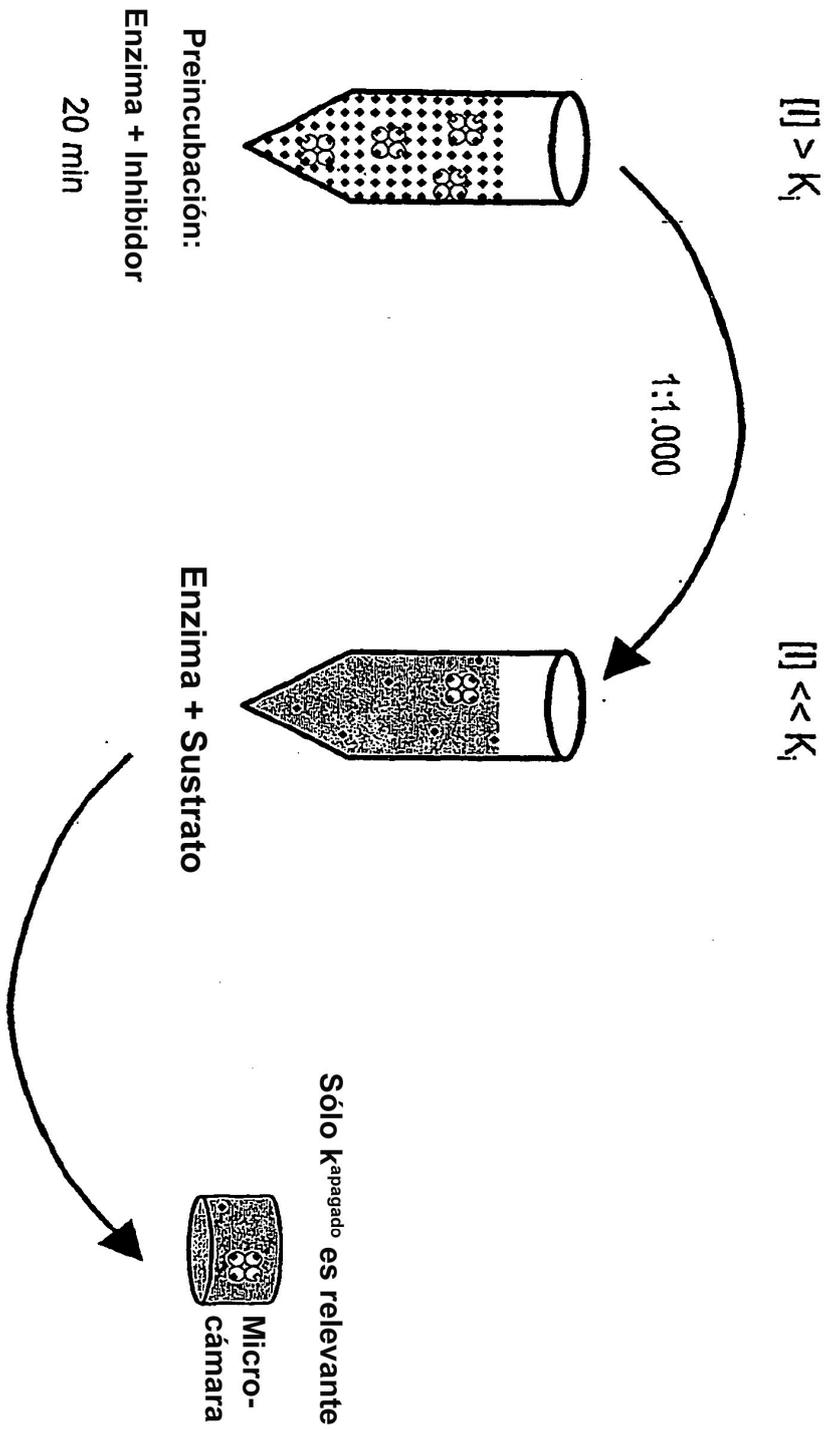
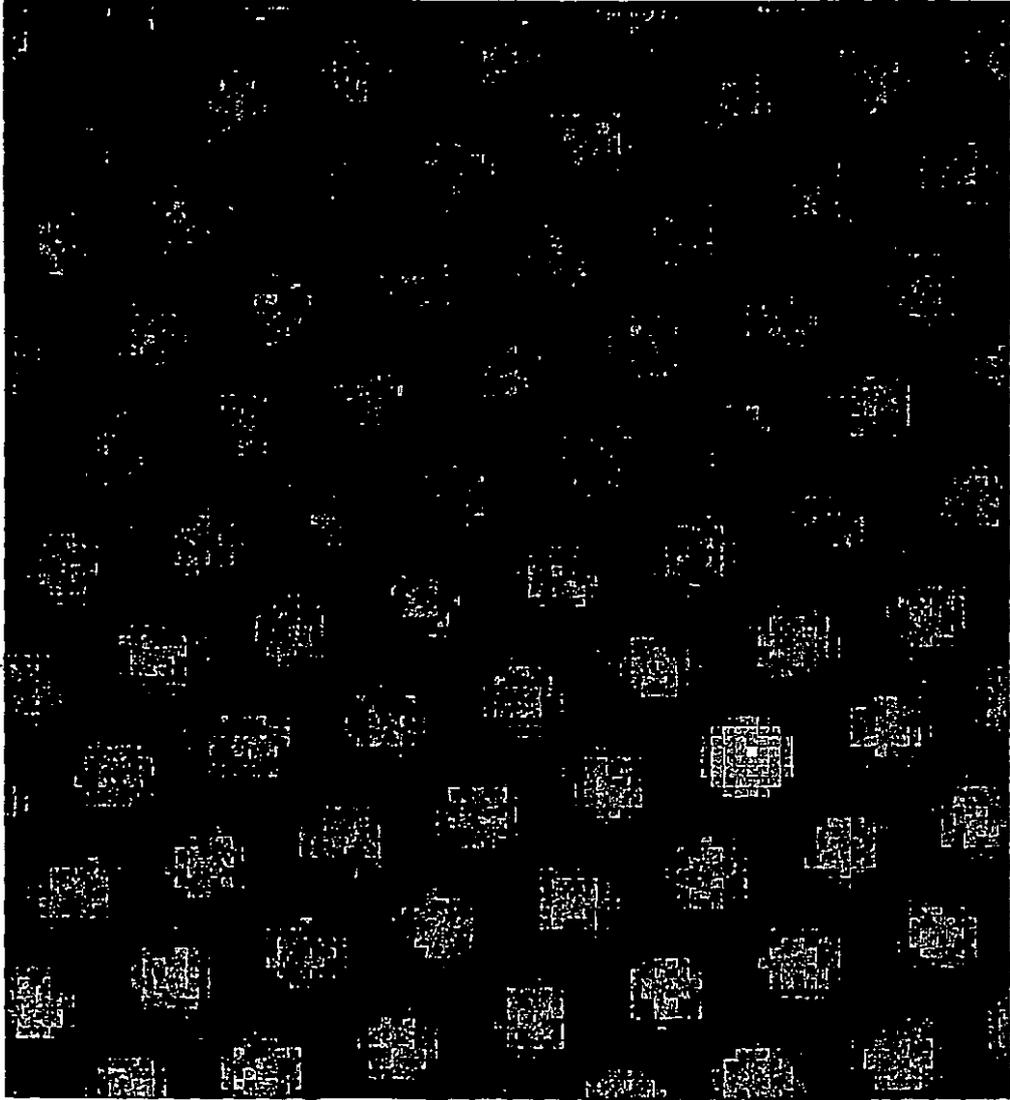
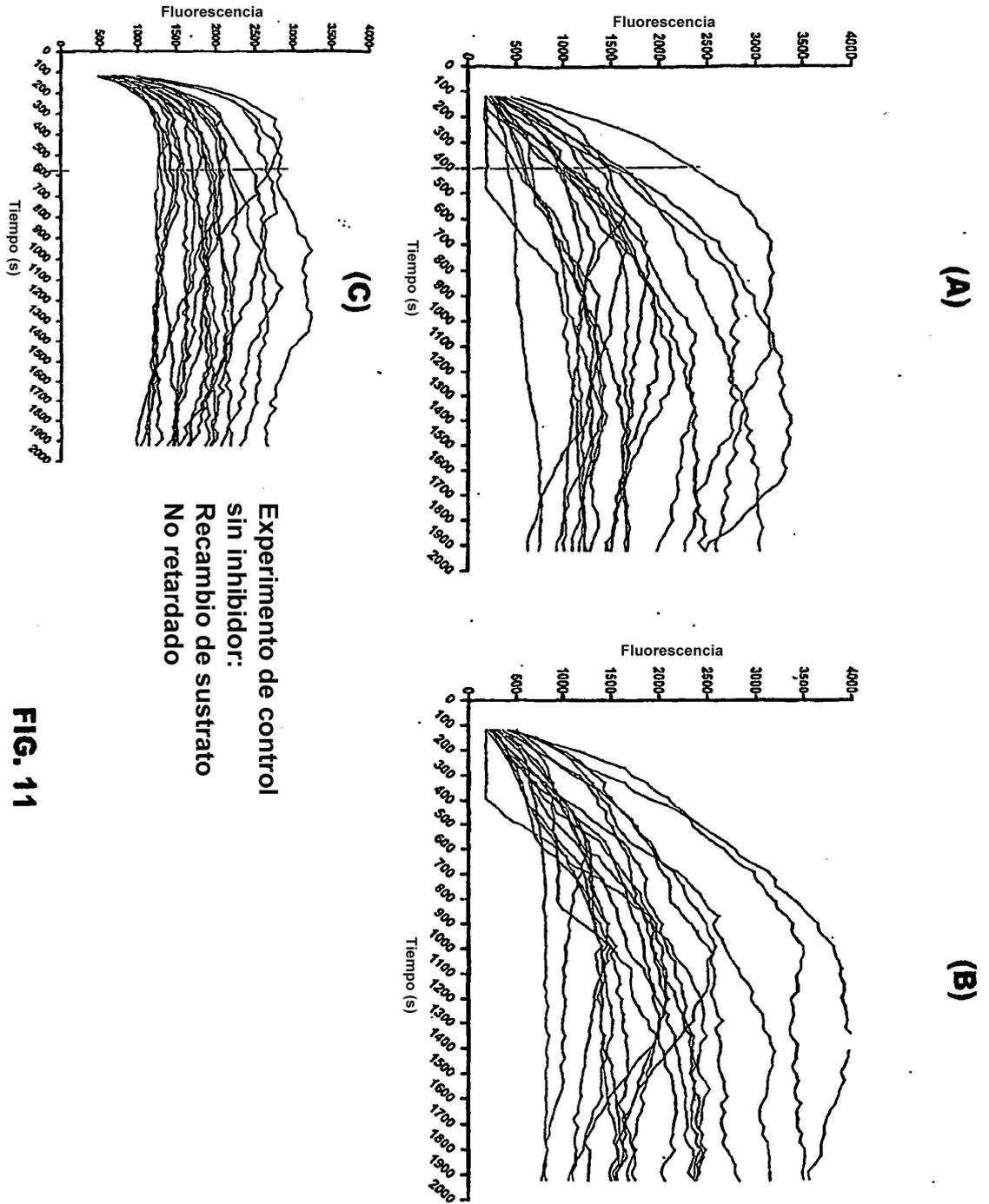


FIG. 9

FIG. 10





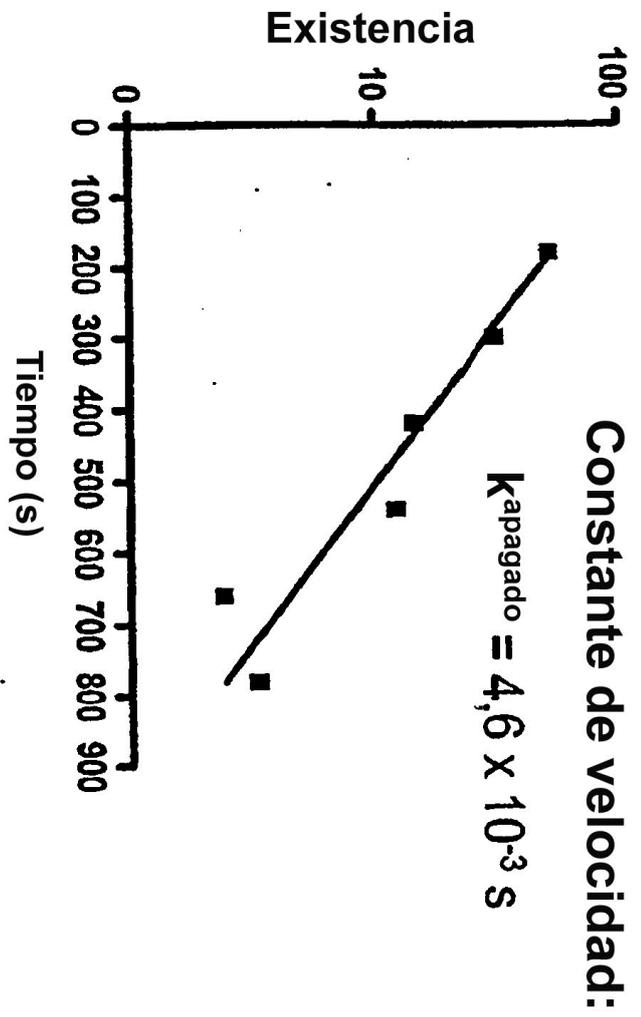
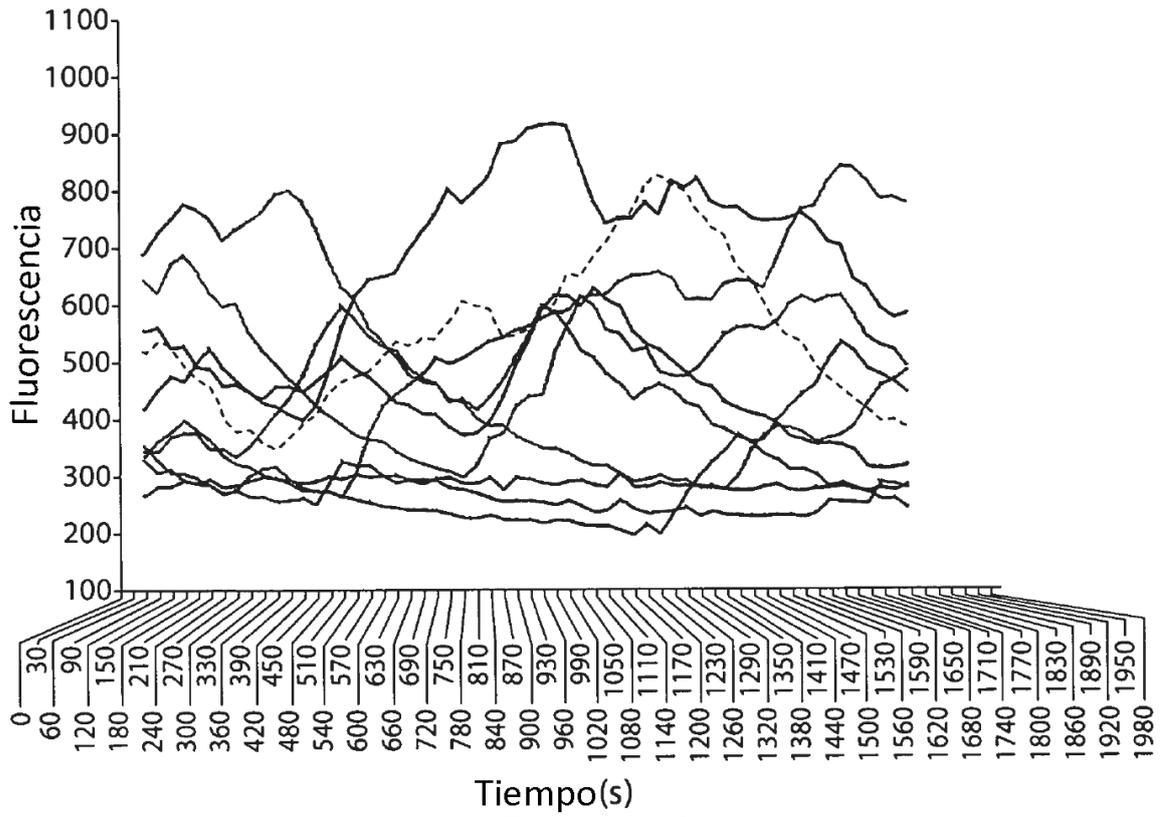
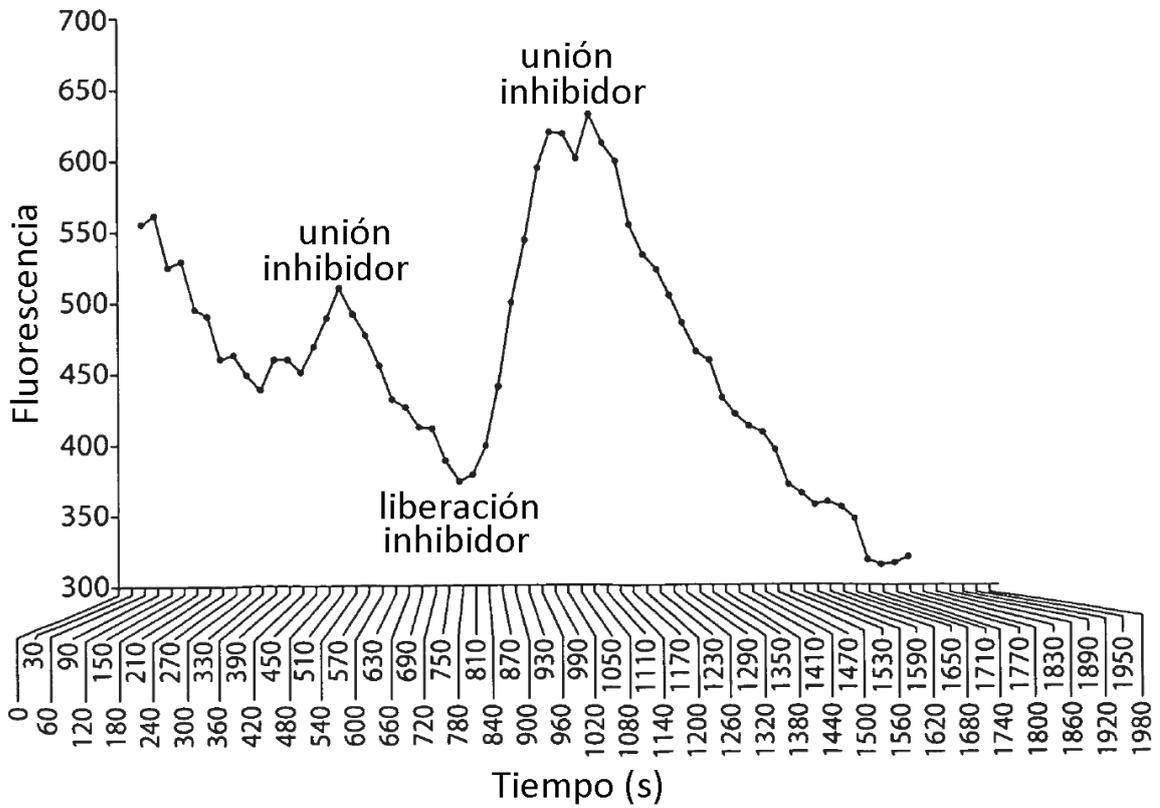


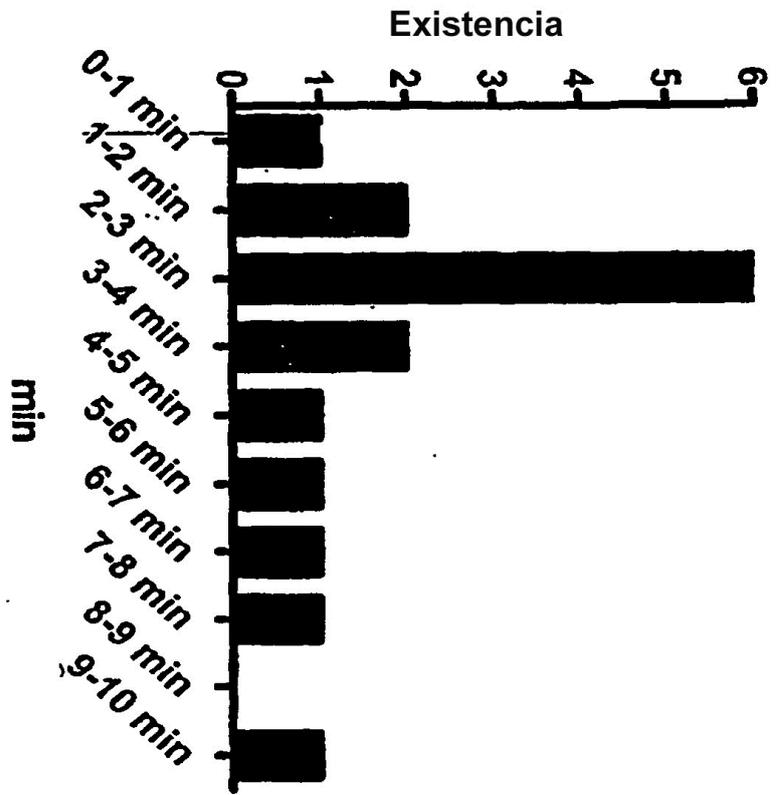
FIG. 12



Tiempo(s)
Fig. 13A



Tiempo (s)
Fig. 13B



$$K^{\text{apagado}} \cong 4,6 \times 10^{-3} \text{ s}$$

$$\Rightarrow \text{Semivida: } \ln 2 / K^{\text{apagado}}$$

$$= 151 \text{ s} = 2 \text{ min}, 30 \text{ s}$$

FIG. 14

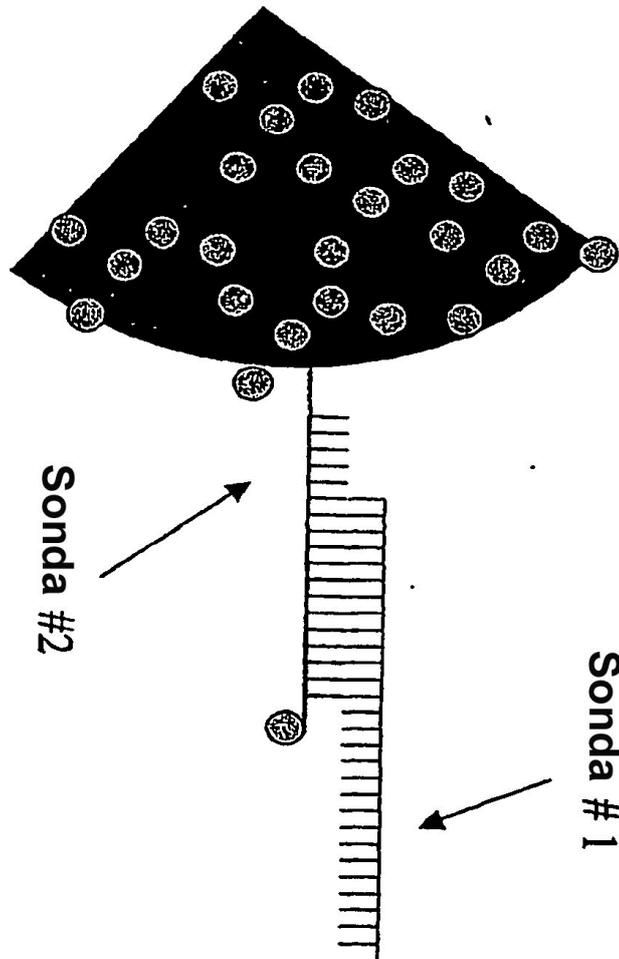
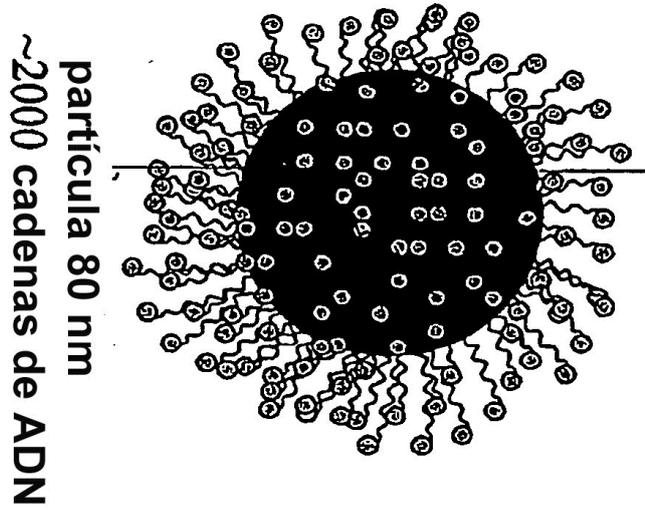


FIG. 15

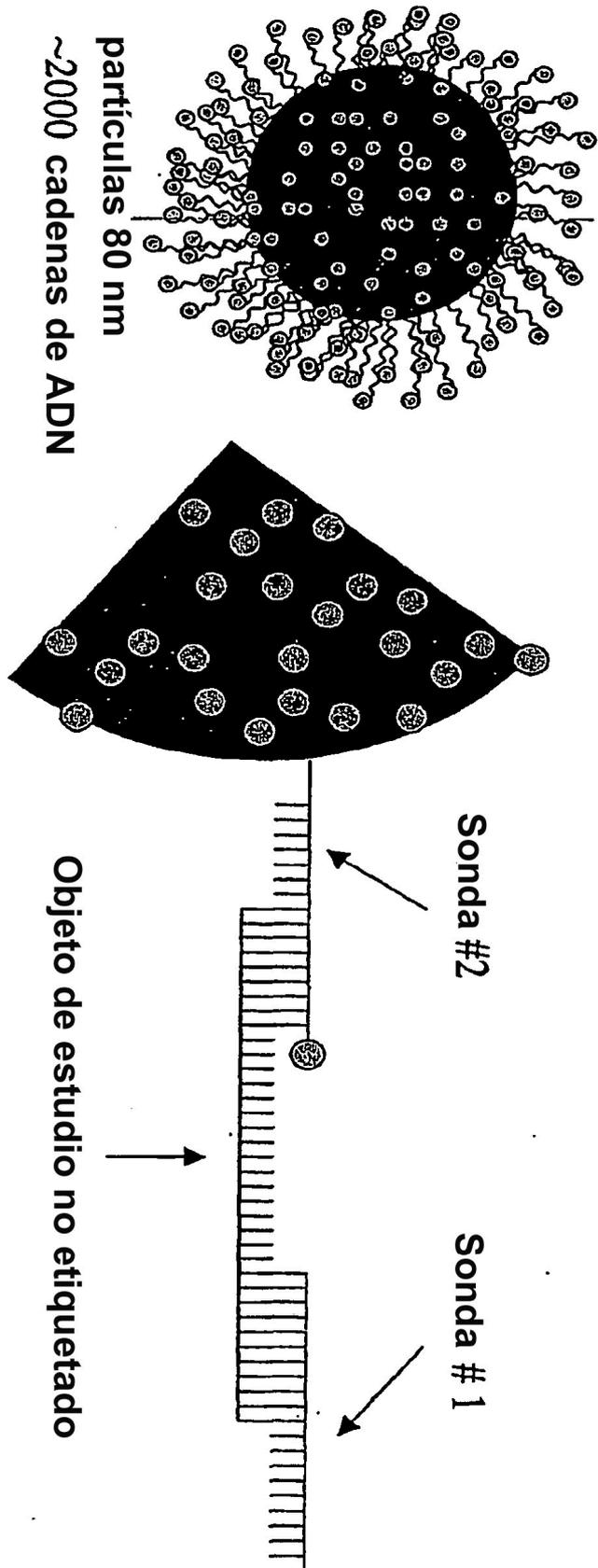


FIG. 16

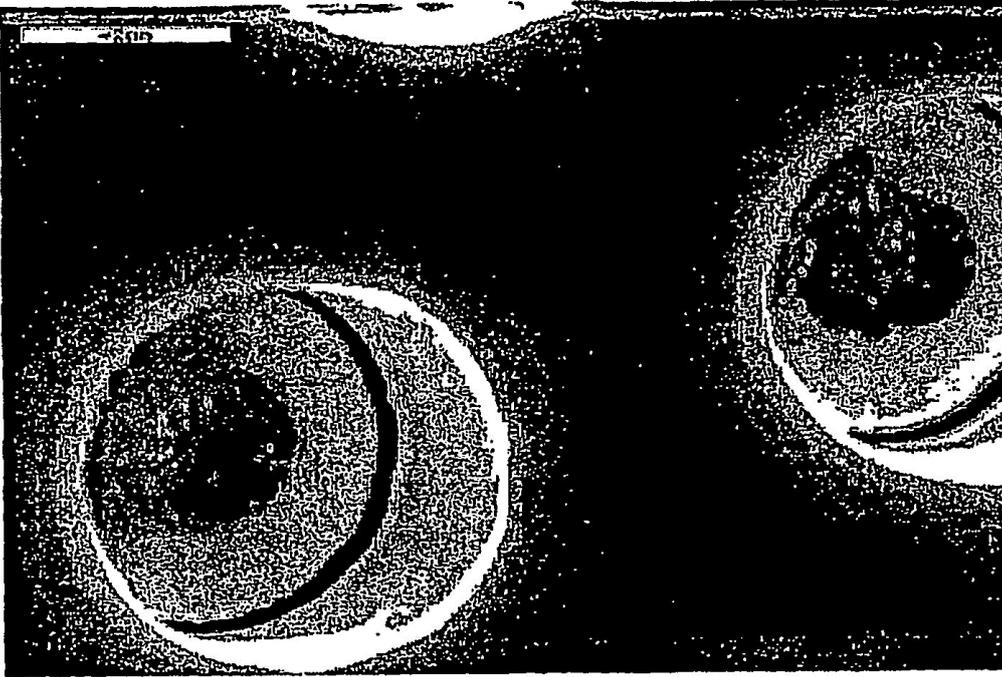


FIG. 17