

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 623 098**

51 Int. Cl.:

G01N 35/02 (2006.01)

G01N 37/00 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.02.2013 PCT/JP2013/055117**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.09.2013 WO13129469**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.02.2013 E 13755655 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.04.2017 EP 2821794**

54 Título: **Procedimiento para remover una solución**

30 Prioridad:

29.02.2012 JP 2012043704

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.07.2017

73 Titular/es:

**TORAY INDUSTRIES, INC. (100.0%)
1-1, Nihonbashi-Muromachi 2-chome
Chuo-ku, Tokyo 103-8666, JP**

72 Inventor/es:

**KURODA, TOSHIHIKO y
NOBUMASA, HITOSHI**

74 Agente/Representante:

DURÁN MOYA, Carlos

ES 2 623 098 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para remover una solución

5 SECTOR TÉCNICO

La presente invención se refiere a un procedimiento para remover una solución que contiene una sustancia a ensayar, procedimiento que se utiliza para poner una solución que contiene una sustancia a ensayar en contacto con una sustancia que se une selectivamente a la sustancia a ensayar inmovilizada en un sustrato (en adelante, denominada "sustancia de unión selectiva") y permitir que éstas reaccionen entre sí.

ANTECEDENTES DE LA TÉCNICA

Un chip de análisis comprende un sustrato en el que se inmoviliza una sustancia de unión selectiva (tal como un ácido nucleico, una proteína, un lípido o un sacárido) que se une selectivamente a una sustancia a ensayar. Se deja que la sustancia de unión selectiva en el sustrato y la sustancia a ensayar experimenten una reacción de hibridación, normalmente en una solución, y, a partir de los resultados de la reacción se analiza la existencia, la situación, la cantidad o similar de una sustancia contenida en la sustancia a ensayar. Como sustrato, se utiliza normalmente un sustrato de vidrio, un sustrato metálico o un sustrato de resina.

Una realización de un chip de análisis se denomina una "micromatriz", en la cual están dispuestas densamente moléculas, tales como ADN, proteínas o cadenas de azúcares en un sustrato con el objetivo, por ejemplo, de ensayar simultáneamente las expresiones de numerosos genes, en cantidades desde varias decenas hasta varias decenas de miles. La utilización de una micromatriz permite la detección y la cuantificación de ácidos nucleicos en base a la reacción de hibridación ácido nucleico-ácido nucleico, o la detección y cuantificación de proteínas y cadenas de azúcares en base a una reacción específica proteína-proteína, cadena de azúcares-cadena de azúcares o cadena de azúcares-proteína, de tal modo que se puede llevar a cabo un análisis sistemático y exhaustivo de la expresión genética, por ejemplo, diversos modelos animales de enfermedades y fenómenos biológicos celulares. Específicamente, se pueden clarificar las funciones de los genes, es decir, las proteínas codificadas por los genes, y se puede identificar la temporización de la expresión de las proteínas así como las ubicaciones de sus acciones. Utilizando micromatrices para analizar las variaciones en la expresión genética de organismos a nivel celular o de tejido, y combinando los datos de fenómenos fisiológicos, biológicos celulares y bioquímicos para construir una base de datos para perfiles de expresión genética, resulta posible investigar genes de enfermedades y genes relacionados con terapias y explorar estrategias terapéuticas.

Entre los chips de análisis, se utilizan micromatrices de ADN (chips de ADN) para la detección, cuantificación y similar de ácidos nucleicos en base a la reacción de hibridación de ácido nucleico-ácido nucleico. Como chip de ADN se utiliza, por ejemplo, un chip en el que un gran número de fragmentos de ADN están densamente dispuestos e inmovilizados sobre un sustrato plano de vidrio. Dicho chip de ADN se utiliza para detectar cada gen contenido en una muestra o para medir la cantidad del mismo, por ejemplo, mediante un procedimiento en el que una muestra preparada marcando los genes expresados en la célula de interés o similar con un tinte fluorescente o similar, es sometida a hibridación para permitir que los ácidos nucleicos complementarios (ADN o ARN) se unan entre sí y la fluorescencia de los sitios de unión sea detectada rápidamente utilizando un dispositivo de detección de alta resolución (escáner), o un procedimiento de detección de una respuesta, tal como una corriente eléctrica, en base a una reacción electroquímica. Los chips de ADN tienen grandes expectativas, no sólo en el análisis de la expresión genética en base a la detección y cuantificación de genes expresados, sino asimismo en sus campos de aplicación, tales como la detección de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP, single nucleotide polymorphisms) en genes.

Además, se han utilizado chips de análisis como un medio para examinar y analizar no sólo ácidos nucleicos, tales como ADN, sino también proteínas y sacáridos. Especialmente, en los chips de análisis de proteínas, se inmovilizan en un sustrato proteínas tales como anticuerpos, antígenos y sustratos de enzimas.

El documento de patente 1 da a conocer un procedimiento para remover una solución que contiene una sustancia a ensayar haciendo girar un chip de análisis que tiene una estructura irregular, y permitiendo de ese modo que se desplacen en el chip de análisis partículas finas o burbujas de aire. En este procedimiento, al permitir que las partículas finas o las burbujas de aire se desplacen sin entrar en contacto con la superficie inmovilizada con una sustancia de unión selectiva, incluso con trazas de la sustancia a ensayar, se puede obtener una buena relación S/R (señal/ruido) y una señal de fluorescencia fuerte.

El documento de patente 2 da a conocer un procedimiento que puede llevar a cabo de manera simple y estable una reacción selectiva entre una sustancia a ensayar y una sustancia de unión selectiva haciendo girar un chip de análisis que tiene una estructura irregular en dirección sustancialmente horizontal y removiendo la solución de la sustancia a ensayar utilizando partículas finas.

El documento de patente 3 da a conocer un procedimiento y un aparato de hibridación en los que, haciendo girar un recipiente que contiene una solución de muestra y partículas finas, y permitiendo que las partículas desciendan en la dirección de la gravedad, se remueve la solución de muestra en el recipiente.

5 El documento de patente 4 da a conocer un procedimiento de hibridación en el que se inyecta una solución de hibridación en una cámara de hibridación especial en la que una micromatriz está dispuesta de tal modo que el espacio de la misma queda parcialmente sin llenar y la cámara gira a continuación para desplazar así la posición del espacio lleno con la solución en la cámara, removiendo de ese modo la solución.

10 El documento de patente 5 da a conocer un aparato de hibridación de tipo de rotación y revolución que remueve una solución de muestra haciendo girar el propio aparato mientras se hace que de vueltas una micromatriz dispuesta en una plataforma giratoria.

15 El documento de patente 6 da a conocer un procedimiento para remover una solución que utiliza un chip de análisis, comprendiendo el chip un soporte y una vasija. La remoción de la solución se lleva a cabo utilizando micropartículas. Las partículas están cerradas de manera estanca dentro de un espacio formado entre el soporte y la vasija.

20 El documento de patente 7 da a conocer un procedimiento para mezclar por lo menos dos partes alícuotas en una estructura de microcanales. Para el mezclado, ambas partes alícuotas se agitan juntas con una burbuja de gas en una cámara de mezclado.

DOCUMENTOS DE LA TÉCNICA ANTERIOR

DOCUMENTOS DE PATENTE

25

[Documento de patente 1] WO 2005/090997

[Documento de patente 2] JP 2007-285828A

30

[Documento de patente 3] JP 2003-339375A

[Documento de patente 4] Patente japonesa número 4473007

35

[Documento de patente 5] Patente U.S.A. número 6309875

[Documento de patente 6] WO 2010/106989

[Documento de patente 7] JP 2010-519536 A

40

CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a procedimientos para remover una solución que contiene una sustancia a ensayar inyectada en un chip de análisis y a procedimientos de análisis de una sustancia a ensayar utilizando lo mencionado anteriormente, según las reivindicaciones adjuntas.

45

PROBLEMAS A RESOLVER MEDIANTE LA INVENCIÓN

50 En el procedimiento para remover una solución según el documento de patente 1, el chip de análisis se hace girar a una velocidad de rotación relativamente lenta, por ejemplo, 3 rpm, y en este caso, la reacción de hibridación requiere 10 horas. Por lo tanto, este procedimiento no es adecuado para una detección rápida de una sustancia a ensayar. Del mismo modo, el procedimiento para remover una solución de una sustancia a ensayar según el documento de patente 2 tampoco es aplicable para una detección rápida de una sustancia a ensayar, debido a que la reacción de hibridación en este procedimiento requiere 16 horas. Además, aunque se manifiesta que el procedimiento dado a conocer en el documento de patente 3 tiene un efecto de reducción del tiempo requerido para la hibridación, la reacción de hibridación requiere de hecho 6 horas; por lo tanto, es difícil aplicar este procedimiento a un análisis en el que se solicite un diagnóstico rápido. Además, en el procedimiento de hibridación dado a conocer en el documento de patente 4, aunque se mejora el valor CV al hacer girar la cámara, en comparación con un caso en el que la reacción se lleva a cabo simplemente dejando la solución para su hibridación, no hay casi ningún cambio en la intensidad de la señal y no se acelera el progreso de la reacción. El aparato dado a conocer en el documento de patente 5 es un aparato que permite remover una micromatriz con una pequeña cantidad de solución de muestra; sin embargo, no se menciona el tiempo necesario para la hibridación y la reducción del mismo, y por lo tanto no está claro que el aparato sea adaptable para un diagnóstico rápido.

65 Estos procedimientos de remoción de la solución dados a conocer en los documentos de patente 1 a 5 están todos ellos dirigidos a mejorar la sensibilidad de la detección aumentando la eficiencia de la reacción de hibridación; sin embargo, la reacción de hibridación en estos procedimientos requiere de hecho de 6 a 20 horas. Por lo tanto, estos

procedimientos no se pueden considerar como tecnologías para mejorar sensiblemente la velocidad de detección o de cuantificación de una sustancia a ensayar utilizando un chip de análisis. Por lo tanto, hasta ahora, en el sector del análisis de una sustancia a ensayar utilizando un chip de análisis, en el que se solicita llevar a cabo una detección o una cuantificación en un tiempo corto de varios minutos a dos horas como máximo, por ejemplo, en las aplicaciones de examen y diagnóstico de enfermedades infecciosas, tales como gripe, septicemia y similares, no se ha presentado un procedimiento para remover una solución de la sustancia a ensayar que permita que el análisis se lleve a cabo con una velocidad tal que satisfaga la solicitud.

La presente invención resuelve los problemas descritos anteriormente, y un objetivo de la presente invención es dar a conocer un medio para acelerar el progreso de una reacción de unión selectiva (reacción de hibridación) entre una sustancia de unión selectiva inmovilizada en un chip de análisis y una sustancia a ensayar, en particular un medio para permitir analizar una sustancia a ensayar en poco tiempo.

MEDIOS PARA RESOLVER LOS PROBLEMAS

Para resolver los problemas descritos anteriormente, los presentes inventores han estudiado a fondo el procedimiento de remover una solución que contiene una sustancia a ensayar mediante el cual, en un análisis de una sustancia a ensayar utilizando un chip de análisis, se puede acelerar la reacción entre la sustancia a ensayar y una sustancia de unión selectiva inmovilizada. Como resultado, los presentes inventores han descubierto que se puede conseguir en poco tiempo una reacción de unión selectiva estable inyectando la solución que contiene la sustancia a ensayar en un hueco del chip de análisis, de tal modo que el espacio del hueco queda parcialmente sin llenar, y haciendo girar el chip de análisis aplicando una aceleración centrífuga no inferior a $1\times g$ con el fin de remover la solución, se completa de ese modo la presente invención.

Es decir, la presente invención está constituida por los siguientes puntos (1) a (7).

(1) Un procedimiento para remover una solución que contiene una sustancia a ensayar inyectada en un chip de análisis, en el que el chip de análisis comprende un hueco en el que se inyecta la solución que contiene la sustancia a ensayar; y una sustancia de unión selectiva, que se une selectivamente a la sustancia a ensayar, que se inmoviliza en la totalidad o en parte de la superficie inferior del hueco, comprendiendo el procedimiento: inyectar la solución que contiene una sustancia a ensayar en el espacio del hueco del chip de análisis, de tal modo que el espacio queda parcialmente sin llenar; y hacer girar el chip de análisis en el que se ha inyectado la solución que contiene la sustancia a ensayar, aplicando una aceleración centrífuga no inferior a $1\times g$.

(2) El procedimiento para remover una solución según (1), en el que el chip de análisis en el que se inyecta la solución que contiene una sustancia a ensayar se hace girar con un radio de giro de 0,1 mm a 20 mm.

(3) El procedimiento para remover una solución según (1) ó (2), en el que la solución que contiene la sustancia a ensayar se inyecta en el hueco descrito anteriormente, de tal modo que queda sin llenar del 10 % al 70 % del espacio.

(4) El procedimiento para remover una solución según cualquiera de (1) a (3), en el que el chip de análisis descrito anteriormente comprende uno o varios huecos en los que se inyecta la solución que contiene una sustancia a ensayar, estando dichos varios huecos separados entre sí por una o varias paredes.

(5) El procedimiento para remover una solución según cualquiera de (1) a (4), en el que el chip de análisis descrito anteriormente está dotado de una tapa que cubre la totalidad del hueco o huecos descritos anteriormente, y la solución que contiene una sustancia a ensayar descrita anteriormente está cerrada de manera estanca en el hueco o huecos.

(6) El procedimiento para remover una solución según cualquiera de (1) a (5), en el que el chip de análisis en el que se inyecta la solución que contiene una sustancia a ensayar está dispuesto de tal modo que la superficie o superficies inferiores del hueco o huecos descritos anteriormente son horizontales o sustancialmente horizontales; y el chip de análisis se hace girar en dirección horizontal o sustancialmente horizontal.

(7) Un procedimiento para analizar una sustancia a ensayar, comprendiendo el procedimiento: permitir que la sustancia a ensayar se una a una sustancia de unión selectiva inmovilizada en un chip de análisis, mediante el procedimiento para remover una solución según cualquiera de (1) a (6); y detectar la sustancia a ensayar unida a la sustancia de unión selectiva.

RESULTADOS DE LA INVENCION

Según el procedimiento para remover una solución de sustancia a ensayar de la presente invención, se puede acelerar de manera efectiva la reacción selectiva entre una sustancia a ensayar y una sustancia de unión selectiva inmovilizada en un chip de análisis, y se pueden aumentar notablemente las probabilidades de que la sustancia de unión selectiva y la sustancia a ensayar se aproximen mutuamente. Por lo tanto, se hace posible detectar o

cuantificar en un corto periodo de tiempo una sustancia a ensayar contenida en una solución de una sustancia a ensayar utilizando un chip de análisis.

Además, según el procedimiento de la presente invención de remoción de la solución de sustancia a ensayar, incluso cuando se utiliza un chip de análisis que tiene una serie de huecos en los que se inyecta una solución que contiene una sustancia a ensayar, dado que la solución en los huecos respectivos se puede remover en las mismas condiciones, la reacción entre la sustancia de unión selectiva y la sustancia a ensayar en los huecos respectivos se puede llevar a cabo asimismo en las mismas condiciones, de tal modo que se puede impedir la aparición de variaciones en la reacción entre los huecos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 muestra realizaciones del chip de análisis de la presente invención. La figura 1(a) muestra una realización en la que el chip de análisis tiene un hueco; la figura 1(b) muestra una realización en la que el chip de análisis tiene una serie de huecos; y la figura 1(c) es una vista, en sección transversal, de un hueco.

La figura 2 muestra realizaciones del chip de análisis de la presente invención. La figura 2(a) muestra una realización en la que el chip de análisis tiene un hueco; la figura 2(b) muestra una realización en la que el chip de análisis tiene una serie de huecos; y la figura 2(c) es una vista, en sección transversal, de un hueco.

La figura 3 muestra realizaciones del chip de análisis de la presente invención. La figura 3(a) muestra una realización en la que el chip de análisis tiene un hueco; la figura 3(b) muestra una realización en la que el chip de análisis tiene una serie de huecos; y la figura 3(c) es una vista, en sección transversal, de un hueco.

La figura 4 muestra realizaciones en las que el chip de análisis de la presente invención está dotado de una tapa. La figura 4(a) muestra una realización en la que el chip de análisis tiene un hueco; la figura 4(b) muestra una realización en la que el chip de análisis tiene una serie de huecos; y la figura 4(c) es una vista, en sección transversal, de un hueco.

La figura 5 muestra vistas superiores que muestran realizaciones de una forma preferente de la superficie inferior de un hueco del chip de análisis, según la presente invención. La figura 5(a) muestra un hueco que tiene un fondo hexagonal; la figura 5(b) muestra un hueco que tiene un fondo tetragonal con esquinas redondeadas; y la figura 5(c) muestra huecos que tienen un fondo elíptico.

La figura 6 es una vista, en sección transversal, del chip de análisis de la presente invención, que muestra una realización en la que se inyecta una solución que contiene una sustancia a ensayar en el chip de análisis.

La figura 7 es un dibujo que muestra la rotación según la presente invención.

La figura 8 es un dibujo que muestra un modo de rotación que incluye revolución.

La figura 9 es un gráfico que muestra las relaciones entre el tiempo de reacción y la intensidad de la señal en los ejemplos 1 a 4 y en los ejemplos comparativos 1 a 3.

La figura 10 es un gráfico, a mayor escala, que muestra la parte del gráfico de la figura 9 en que el tiempo de reacción es de 0 a 1 h.

MODO PARA LLEVAR A CABO LA INVENCION

En la presente invención, el término "chip de análisis" se refiere a un chip en el que se inyecta una solución que contiene una sustancia a ensayar (en adelante, se puede denominar asimismo "solución de la sustancia a ensayar") con el objetivo de detectar la existencia de una sustancia a ensayar y de medir la cantidad, las propiedades y similares de la sustancia a ensayar. Ejemplos específicos del mismo incluyen biochips para medir la cantidad o la existencia de una sustancia a ensayar en base a la reacción entre una sustancia de unión selectiva inmovilizada en la superficie de soporte y la sustancia a ensayar. Ejemplos más específicos incluyen chips de ADN en los que se inmovilizan ácidos nucleicos en la superficie de soporte; chips de proteínas en los que se inmovilizan en la superficie de soporte proteínas representadas por anticuerpos; chips de cadenas de azúcares en los que se inmovilizan cadenas de azúcares en la superficie de soporte; y chips de células en los que se inmovilizan células en la superficie de soporte.

En el chip de análisis utilizado en la presente invención, están formados uno o varios huecos en los que se inyecta una solución que contiene una sustancia a ensayar. Cada hueco forma un espacio constituido por una superficie de una pared y una superficie inferior, y se inmoviliza una sustancia de unión selectiva en la totalidad o en parte de la superficie inferior del hueco.

Se describirán a continuación realizaciones del chip de análisis utilizado en la presente invención, haciendo referencia a las figuras 1 a 6.

La figura 1 muestra chips de análisis constituidos por un sustrato plano -1- (por ejemplo, un portaobjetos de vidrio) y un material -2- de placa que tiene uno o varios orificios pasantes. El sustrato -1- y el material -2- de placa que tienen uno o varios orificios pasantes se unen para formar uno o varios huecos -6- (o uno o varios espacios huecos) constituidos por una superficie inferior -3- y una superficie de pared -4-. La figura 1(a) muestra una realización en la que el chip de análisis tiene un hueco -6-; la figura 1(b) muestra una realización en la que el chip de análisis tiene una serie de huecos 6s; y la figura 1(c) es una vista, en sección transversal, de cada hueco. Una sustancia de unión selectiva está inmovilizada en una parte de la superficie (superficie superior) del sustrato -1-, y esta superficie forma la superficie -5- de la sustancia de unión selectiva inmovilizada en una parte de la superficie inferior -3- de cada hueco -6- cuando el sustrato -1- y el material -2- de placa se unen.

En dicho chip de análisis tal como el que se muestra en la figura 1, que está constituido por un sustrato plano en el que se inmoviliza una sustancia de unión selectiva y un material de placa que comprende uno o varios orificios pasantes para la formación de uno o varios huecos, el material del sustrato plano y el material de la placa no están particularmente limitados y, por ejemplo, se puede utilizar preferentemente un material inorgánico tal como vidrio, cerámica o silicio, o un material polimérico, tal como tereftalato de polietileno, acetato de celulosa, policarbonato, poliestireno, polimetilmetacrilato o caucho de silicona. El procedimiento de unión del sustrato plano y el material de placa tampoco está particularmente limitado, y el sustrato plano y el material de placa pueden estar adheridos utilizando un adhesivo de manera sustancialmente no despegable, o se pueden adherir por medio de una cinta adhesiva de doble cara o de una capa adhesiva fabricada de una composición de resina o similar, de manera despegable. Además, el número de huecos por chip de análisis se puede ajustar en función del objetivo del análisis, y se puede formar un hueco o una serie de huecos.

Las figuras 2 y 3 muestran chips de análisis en los que están formados uno o varios huecos -6- en el sustrato -1-, por ejemplo, mediante moldeo por inyección, sin utilizar el material de placa que tiene uno o varios orificios pasantes mostrado en la figura 1. Cada hueco -6- formado en el sustrato -1- comprende un espacio constituido por la superficie inferior -3- y la superficie de pared -4-, y una parte de la superficie inferior -3- del hueco es la superficie -5- de la sustancia de unión selectiva inmovilizada. Cada una de las figuras 2(a) y 3(a) muestra una realización en la que el chip de análisis tiene un hueco; cada una de las figuras 2(b) y 3(b) muestra una realización en la que el chip de análisis tiene una serie de huecos; y cada una de las figuras 2(c) y 3(c) muestra una realización de la sección transversal del hueco. El número de huecos por chip de análisis se puede seleccionar arbitrariamente de acuerdo con el objetivo del análisis.

En los chips de análisis mostrados en las figuras 2 y 3, como material del sustrato, se puede utilizar el mismo material que el del sustrato de los chips de análisis descritos anteriormente, mostrados en la figura 1.

En el chip de análisis utilizado en el procedimiento para remover una solución según la presente invención, la profundidad del hueco o huecos no está particularmente limitada; sin embargo, ésta es preferentemente de 0,1 a 10 mm, más preferentemente de 0,5 a 5 mm. La figura 2 muestra realizaciones del chip de análisis de un tipo que tiene uno o varios huecos poco profundos -6- y la figura 3 muestra realizaciones del chip de análisis del tipo de uno o varios huecos profundos -6-.

Cuando el chip de análisis en el que se inyecta a la solución de sustancia a ensayar se hace girar, en los casos en que se utiliza dicho chip de análisis que tiene uno o varios huecos profundos que se muestra en la figura 3, el chip de análisis puede girar tal como está, sin ajustar una tapa sobre el mismo. Al mismo tiempo, en los casos en que se utiliza dicho chip de análisis que tiene uno o varios huecos poco profundos como se muestra en la figura 2, es preferente que se ajuste una tapa que cubra la totalidad del hueco o huecos con el fin de cerrar de manera estanca la solución de sustancia a ensayar en el hueco o huecos. Por ejemplo, cuando la profundidad del hueco o huecos es de 5 mm o menor, es preferente que se ajuste una tapa de acuerdo con las condiciones de rotación del chip de análisis (aceleración centrífuga, velocidad de rotación y radio de rotación).

La figura 4 muestra realizaciones en las que el chip de análisis está dotado de una tapa -7- que cubre la totalidad del hueco o huecos -6-, y la solución de la sustancia a ensayar está cerrada de manera estanca en el hueco o huecos -6-. Más específicamente, la figura 4 muestra realizaciones en las que el chip de análisis mostrado en las figuras 2 ó 3 está dotado de la tapa -7- de placa plana. La figura 4(a) muestra una realización en la que el chip de análisis tiene un hueco; la figura 4(b) muestra una realización en la que el chip de análisis tiene una serie de huecos; y la figura 4(c) es una vista, en sección transversal, de un hueco. En estas realizaciones, la tapa -7- comprende orificios de inyección -8- para inyectar una solución de la sustancia a ensayar en el hueco o huecos.

Como tapa, se puede utilizar una placa plana fabricada de resina, caucho, vidrio o similares, o un material de sellado tal como una cinta adhesiva. Dotando a la tapa de uno o varios orificios de inyección para inyectar una solución de la sustancia a ensayar en el hueco o huecos, la tapa se puede ajustar después de inyectar la solución de la sustancia a ensayar en el hueco. En este caso, es preferente que la tapa tenga una serie de orificios de inyección y, por ejemplo, se pueden formar de 2 a 4 orificios de inyección por hueco. Al mismo tiempo, en los casos en que la tapa se monta

después de inyectar la solución de sustancia a ensayar, puede o no estar formado un orificio de inyección en la tapa y, por ejemplo, se puede utilizar adecuadamente un procedimiento de cobertura y cierre estanco de la abertura con una cinta adhesiva, un procedimiento de cierre estanco de la abertura poniendo en estrecho contacto con la abertura un material de placa en el que esté fijada una junta tórica que se adapte a la forma de la abertura, o un procedimiento de cobertura y cierre estanco de la abertura con una sustancia de tipo arcilla.

Cuando se lleva a cabo una reacción de hibridación, en los casos en que es necesario impedir la evaporación de la solución de sustancia a ensayar o mantener estrictamente constante la temperatura de reacción, es preferente que el espacio o espacios huecos del chip de análisis se cierren de manera estanca y, en este caso, es preferente que el chip de análisis esté dotado de una tapa.

En el chip de análisis utilizado en el procedimiento para remover una solución según la presente invención, es preferente que la superficie inferior de cada hueco tenga una forma que permita que el espacio (o burbuja de aire) en el hueco que queda sin llenar con la solución de la sustancia a ensayar, se desplace fácilmente cuando se hace girar el chip de análisis. Por ejemplo, tal como se muestra en la figura 5, es preferente utilizar un chip de análisis en el que la superficie inferior de cada hueco tenga (a) una forma hexagonal, (b) una forma tetragonal o (c) una forma elíptica, dado que esto permite desplazar fácilmente el espacio (o burbuja de aire) -9- que queda en el hueco. Además, en los casos en que la superficie inferior de cada hueco tiene una forma poligonal, es preferente que las esquinas de la misma sean redondeadas (por ejemplo, tal como en la figura 5(b)) dado que esto permite asimismo desplazar fácilmente el espacio (o burbuja de aire) que queda sin llenar con la solución a ensayar en el hueco.

La figura 6 es una vista, en sección transversal, tomada en la proximidad de un hueco del chip de análisis, que muestra una realización en la que se inyecta una solución que contiene una sustancia a ensayar en el chip de análisis dotado de la tapa. Muestra una situación en la que se ha inyectado una solución que contiene una sustancia a ensayar al espacio -6- en el hueco del chip de análisis; se ha formado un espacio (o burbuja de aire) -9- que no está lleno con la solución; y se ha montado la tapa -7-. Haciendo girar el chip de análisis en la situación mostrada en la figura 6, la solución de sustancia a ensayar puede ser removida para llevar a cabo una reacción de hibridación.

En la presente invención, el término "sustancia de unión selectiva" significa una sustancia que se une selectivamente a una sustancia a ensayar, directa o indirectamente. Ejemplos representativos de la sustancia de unión selectiva que se puede unir a la superficie de un soporte incluyen ácidos nucleicos, proteínas, péptidos, sacáridos y lípidos.

Los ejemplos de ácidos nucleicos incluyen ADN y ARN, y el ácido nucleico puede ser asimismo un APN o un ANB. Ejemplos de ADN que se pueden utilizar incluyen, pero de forma no limitativa, ADN cromosómicos, ADN virales y ADN de bacterias, hongos y similares, así como ADNc obtenidos mediante transcripción inversa de ARN, y fragmentos parciales de estos ADN. Además, los ejemplos de ARN que pueden ser utilizados incluyen, pero de forma no limitativa, ARN mensajero, ARN ribosomal, ARN pequeño, micro-ARN y fragmentos parciales de estos ARN. Además, se pueden incluir asimismo en los ejemplos ADN, ARN y similares sintetizados químicamente. Un ácido nucleico monocatenario que tenga una secuencia de bases específica se hibrida selectivamente y se une con un ácido nucleico monocatenario que tenga una secuencia de bases que sea complementaria a la secuencia de bases específica o a una parte de la misma; por lo tanto, dicho ácido nucleico monocatenario corresponde asimismo a la "sustancia de unión selectiva" definida en la presente invención. El ácido nucleico puede ser uno derivado de un producto natural tal como una célula viva, o puede ser uno sintetizado utilizando un sintetizador de ácidos nucleicos. La preparación de ADN o ARN a partir de una célula viva se puede llevar a cabo mediante un procedimiento conocido. Por ejemplo, se puede extraer ADN mediante el procedimiento de Blin y otros (Blin y otros, Nucleic Acids Res. 3:2303 (1976)) o similar, y se puede extraer ARN mediante el procedimiento de Favaloro y otros (Favaloro y otros, Methods Enzymol. 65:718 (1980)) o similar. Como el ácido nucleico que se tiene que inmovilizar, se puede utilizar por ejemplo, asimismo un ADN plasmídico lineal o circular o ADN cromosómico, un fragmento de ADN obtenido desdoblado estos ADN con una enzima de restricción o mediante desdoblamiento químico de estos ADN, un ADN sintético preparado in vitro utilizando una enzima o similar, o un oligonucleótido sintetizado químicamente.

Los ejemplos de proteínas incluyen anticuerpos, fragmentos de anticuerpos de unión a antígenos tales como fragmentos Fab y fragmentos F(ab')₂, y diversos antígenos. Un anticuerpo o un fragmento de unión a un antígeno del mismo, se une selectivamente a su antígeno correspondiente, y un antígeno se une selectivamente a su anticuerpo correspondiente; por lo tanto, estos corresponden asimismo a la "sustancia de unión selectiva".

Los ejemplos de sacáridos incluyen diversos monosacáridos y cadenas de azúcares, tales como oligosacáridos y polisacáridos.

Los ejemplos de lípidos incluyen lípidos simples y lípidos complejos.

Además, se puede inmovilizar asimismo una sustancia antigénica distinta a los ácidos nucleicos, proteínas, sacáridos y lípidos descritos anteriormente. Además, como sustancia de unión selectiva, se pueden inmovilizar asimismo células en la superficie del soporte.

Entre estas sustancias de unión selectiva, las particularmente preferentes incluyen ADN, ARN, proteínas, péptidos, sacáridos, cadenas de azúcares y lípidos.

5 Los ejemplos de la sustancia a ensayar utilizada en la presente invención incluyen, pero de forma no limitativa, ácidos nucleicos que se tienen que medir (ácidos nucleicos diana), tal como genes de bacterias patógenas, virus y similares, genes causantes de enfermedades hereditarias, y partes de los mismos; diversos componentes biológicos antigénicos; y anticuerpos contra bacterias patógenas, virus y similares.

10 En el procedimiento para remover una solución según la presente invención, los ejemplos de soluciones que contienen estas sustancia a ensayar que pueden ser utilizadas incluyen, pero de forma no limitativa, fluidos corporales tales como sangre, suero, plasma, orina, heces, fluido espinal, saliva y diversos fluidos tisulares; diversos alimentos y bebidas; y diluciones de los mismos. En este caso, la viscosidad de la solución que contiene una sustancia a ensayar no está particularmente limitada siempre que el espacio o espacios huecos del chip de análisis que no se llenan con la solución de sustancia a ensayar sean desplazables cuando se hace girar el chip de análisis aplicando una aceleración centrífuga.

15 El ácido nucleico utilizado como sustancia a ensayar puede ser uno que se extraiga de la sangre o de una célula mediante un procedimiento convencional y a continuación se marque, o puede ser uno que se amplifique mediante un procedimiento de amplificación de ácido nucleico tal como PCR, utilizando el ácido nucleico como plantilla. En el último caso, después de llevar a cabo el procedimiento de remoción de la presente invención, se puede mejorar considerablemente la sensibilidad de las mediciones. En los casos en que se utiliza un producto de amplificación de un ácido nucleico como sustancia a ensayar, llevando a cabo la amplificación en presencia de nucleósido trifosfato marcado con una sustancia fluorescente o similar, se puede marcar el ácido nucleico amplificado resultante. Además, en los casos en que la sustancia a ensayar sea un antígeno o un anticuerpo, el antígeno o anticuerpo utilizado como sustancia a ensayar se puede marcar directamente mediante un procedimiento convencional. Alternativamente, se puede utilizar asimismo un procedimiento en el que, después de permitir que el antígeno o el anticuerpo que es la sustancia a ensayar se una con una sustancia de unión selectiva, se lava el soporte y se permite que un anticuerpo o antígeno marcado que experimenta una reacción antígeno-anticuerpo reaccione con el antígeno o anticuerpo, seguido por la medición del marcador unido al soporte. Además, en los casos en que se utiliza un ácido nucleico no amplificado como sustancia a ensayar, por ejemplo, se puede utilizar preferentemente un procedimiento en el que, después de eliminar el grupo fosfato del extremo 5' del ácido nucleico con fosfatasa alcalina, se deja que la sustancia a ensayar marcada con una sustancia fluorescente reaccione con una sustancia de unión selectiva y se mide a continuación el marcador ligado, o un procedimiento en el que, después de capturar la sustancia a ensayar utilizando una sustancia de unión selectiva (sonda de captura), se permite que una sonda de detección marcada con una sustancia fluorescente o similar se una a la sustancia a ensayar y se mide a continuación el marcador de la sonda de detección (procedimiento de hibridación en sándwich).

20 En el procedimiento para remover una solución según la presente invención, una sustancia a ensayar sometida al marcado, amplificación y similar descritos anteriormente es disuelta en una solución acuosa, una solución tampón apropiada o similar, para preparar una solución que contenga la sustancia a ensayar (solución de la sustancia a ensayar).

25 En el procedimiento para remover una solución según la presente invención, la solución de la sustancia a ensayar se inyecta al espacio o espacios huecos del chip de análisis, de tal modo que el espacio o espacios huecos quedan parcialmente sin llenar de manera que en el hueco o huecos se forma un espacio sin llenar con la solución de la sustancia a ensayar. Al no llenar completamente el espacio o espacios huecos con la solución de la sustancia a ensayar para formar un espacio sin llenar con la solución de la sustancia a ensayar, el espacio sin llenar se desplaza en el interior de cada hueco cuando se hace girar el chip de análisis, con lo que se remueve la solución de la sustancia a ensayar. Cuando se hace girar el chip de análisis, el espacio sin llenar formado en cada hueco puede existir como un único espacio, o puede existir como una serie de espacios divididos, es decir, como una serie de burbujas de aire.

30 En lo que se refiere a la proporción del espacio sin llenar con la solución de la sustancia a ensayar con respecto al espacio o espacios huecos, el límite inferior de la misma, preferentemente, no es menor del 10 %, más preferentemente no es menor del 20 %, y el límite superior de la misma preferentemente no es mayor del 90 %, más preferentemente no es mayor del 80 %, aún más preferentemente no es mayor del 70 %. La proporción del espacio sin llenar con la solución de la sustancia a ensayar está comprendida preferentemente en el intervalo del 10 % al 90 %, más preferentemente del 15 % al 80 %, aun más preferentemente del 20 % al 70 %. Cuando la proporción es menor del 5 %, la solución de la sustancia a ensayar no se desplaza lo suficiente dentro del espacio hueco durante la rotación del chip de análisis, de tal modo que la solución de la sustancia a ensayar no se puede remover significativamente. Al mismo tiempo, cuando la proporción es mayor del 90 %, se reduce la probabilidad de que la solución que contiene una sustancia a ensayar entre en contacto con la zona en la que está inmovilizada la sustancia de unión selectiva, lo que impide el progreso de la reacción. Además, en los casos en que se hace girar dicho chip de análisis que tiene uno o varios huecos profundos, tal como se muestra en la figura 3, sin ajustar una tapa sobre el mismo, la proporción del espacio sin llenar con la solución de la sustancia a ensayar es, por ejemplo, preferentemente del 30 % al 90 %, más preferentemente del 40 % al 80 %.

En el procedimiento para remover una solución según la presente invención, el chip de análisis en el que se inyecta una solución que contiene una sustancia a ensayar es sometida a rotación para remover la solución. El término "rotación" utilizado en la presente memoria significa que se hace girar el propio chip de análisis alrededor de un eje de rotación mediante movimiento circular o movimiento elíptico. Más particularmente, el término "rotación" utilizado en la presente invención se refiere a un modo de rotación que se lleva a cabo de manera que se observa un movimiento circular que tiene el mismo radio con un único centro de rotación y el mismo radio para cualquier punto arbitrario en el chip de análisis. La figura 7 muestra una realización de la rotación, según la presente invención. Con respecto a los puntos arbitrarios -A- y -B- en un chip de análisis -10-, el punto -A- gira a una velocidad de rotación prescrita en una órbita circular que tiene su centro en -OA- y un radio -r-. Del mismo modo, el punto -B- gira asimismo a una velocidad de rotación prescrita en una órbita circular que tiene su centro en -OB- y un radio -r-. En este caso, las líneas rectas -AB- que conectan los puntos arbitrarios -A- y -B- en el chip de análisis son siempre paralelas en una órbita arbitraria del movimiento circular. Por ejemplo, en la figura 7, incluso cuando el chip de análisis -10- está situado en cualquiera de las posiciones -P1-, -P2-, -P3- y -P4-, las líneas rectas -AB- son paralelas entre sí. Al mismo tiempo, en los casos en que el modo de rotación incluye revolución, tal como una rotación orbital o una revolución rotatoria, tal como se muestra en la figura 8, las distancias entre el centro de revolución, -O-, y los respectivos puntos arbitrarios -A- y -B- en el chip de análisis -10- (r_a , r_b) son diferentes. Es decir, en el modo de rotación que incluye revolución, el radio de rotación del movimiento circular varía en función de la posición en el chip de análisis.

Cuando se hace girar el chip de análisis, es preferente que el chip de análisis esté dispuesto de tal modo que la superficie en la que está inmovilizada la sustancia de unión selectiva sea paralela o sustancialmente paralela al plano de rotación.

En los casos en que se utiliza un chip de análisis que tiene una serie de huecos en los que se inyecta la solución que contiene la sustancia a ensayar, dado que la solución en los huecos respectivos se puede remover en las mismas condiciones haciendo girar el chip de análisis, la reacción entre la sustancia de unión selectiva y la sustancia a ensayar en los huecos respectivos se puede llevar a cabo asimismo en las mismas condiciones, de tal modo que se puede reducir preferentemente la variación de la reacción entre los huecos. Al mismo tiempo, en los casos en que la remoción se lleva a cabo mediante un procedimiento de rotación-revolución en el que se hace girar el chip de análisis mientras da vueltas, o mediante un procedimiento de revolución en el que el centro de rotación está situado fuera del chip de análisis, dado que la serie de huecos están removidos cada uno en condiciones diferentes, se pueden producir variaciones en la reacción entre los huecos.

La dirección del plano de rotación en el giro del chip de análisis no está limitada particularmente y el chip de análisis se puede hacer girar, por ejemplo, en la dirección horizontal o sustancialmente horizontal, en una dirección inclinada de 15° respecto a la dirección horizontal, en una dirección inclinada de 30° respecto a la dirección horizontal, en una dirección inclinada de 45° respecto a la dirección horizontal, en una dirección inclinada de 60° respecto a la dirección horizontal, en una dirección inclinada de 75° respecto a la dirección horizontal, o en dirección vertical o sustancialmente vertical. La dirección del plano de rotación es preferentemente la dirección horizontal o sustancialmente horizontal. En este caso, el término "dirección sustancialmente horizontal" significa una dirección que es casi horizontal con respecto a la superficie del chip de análisis en la que se inmoviliza una sustancia de unión selectiva y es preferentemente, por ejemplo, una dirección inclinada en un intervalo de 0° a 3° con respecto al plano horizontal. Además, el término "dirección sustancialmente vertical" significa una dirección que es casi vertical con respecto a la superficie del chip de análisis en la que se inmoviliza una sustancia de unión selectiva y es preferentemente, por ejemplo, una dirección inclinada en un intervalo de 0° a 3° con respecto al plano vertical.

En la presente invención, el chip de análisis se puede hacer girar a una velocidad de rotación constante o a velocidades de rotación variables. Alternativamente, el chip de análisis se puede hacer girar intermitentemente, por ejemplo, deteniendo la rotación durante un cierto periodo de tiempo. Además, el sentido de la rotación no está limitado particularmente y puede ser horario o antihorario, o una combinación de ambos.

El tiempo de rotación del chip de análisis para llevar a cabo la reacción no está limitado particularmente, y se puede determinar apropiadamente dentro de un intervalo tal que sea suficiente para permitir que la sustancia de unión selectiva y la sustancia a ensayar reaccionen entre sí. Por ejemplo, en los casos en que la sustancia a ensayar es un ácido nucleico, el tiempo de rotación se puede ajustar de acuerdo con el tiempo necesario para que tenga lugar la reacción de hibridación entre el ácido nucleico y un ácido nucleico de sonda que es la sustancia de unión selectiva. El procedimiento para remover una solución según la presente invención se caracteriza porque, aplicando una aceleración centrífuga no menor de $1 \times g$ en el tiempo de rotación del chip de análisis, la reacción selectiva entre la sustancia a ensayar y la sustancia de unión selectiva se puede acelerar de manera efectiva y por lo tanto la sustancia a ensayar puede ser detectada o cuantificada en poco tiempo. Aprovechando esta característica distintiva, particularmente en los casos en que se solicita una detección o cuantificación rápida, tal como cuando se utiliza el chip de análisis en una aplicación de examen/diagnóstico, es preferente que el chip de análisis se haga girar durante un tiempo corto. Por ejemplo, en el caso de hibridación de ácidos nucleicos, el tiempo de reacción es preferentemente de 3 a 4 horas, más preferentemente de 2 horas o menos, aún más preferentemente de 1 hora o menos, particularmente preferente de 0,5 horas o menos.

Por lo general, la aceleración centrífuga representa, en un sistema de movimiento rotacional, la magnitud de la fuerza centrífuga aplicada a un objeto en forma de aceleración, y la aceleración centrífuga es proporcional al valor absoluto de la distancia desde el centro de rotación y al cuadrado de la velocidad angular del movimiento de rotación. En la presente invención, la aceleración centrífuga significa una fuerza centrífuga, es decir, una fuerza centrífuga relativa (RCF, relative centrifugal force), y se calcula mediante la siguiente ecuación 1.

$$RCF = 1,118 \times R \times N^2 \times 10^{-8} \quad (\text{Ecuación 1})$$

RCF: fuerza centrífuga relativa ($\times g$)

R: radio de rotación (cm)

N: velocidad de rotación (rpm)

En el procedimiento para remover una solución según la presente invención, cuando se hace girar el chip de análisis se aplica una aceleración centrífuga no menor de $1 \times g$. El límite inferior de la aceleración centrífuga es preferentemente no menor de $5 \times g$, más preferentemente no menor de $10 \times g$. El límite superior de la aceleración centrífuga no está limitado particularmente; sin embargo, preferentemente es de $50 \times g$ o menor, más preferentemente de $40 \times g$ o menor, aún más preferentemente de $30 \times g$ o menor. La aceleración centrífuga está comprendida preferentemente en el intervalo de $1 \times g$ a $50 \times g$, más preferentemente de $5 \times g$ a $40 \times g$, aún más preferentemente de $10 \times g$ a $30 \times g$.

En el procedimiento para remover una solución según la presente invención, la aceleración centrífuga deseada puede ser aplicada ajustando adecuadamente la velocidad de rotación y el radio de rotación cuando se hace girar el chip de análisis. Por lo tanto, la velocidad de rotación y el radio de rotación se pueden seleccionar de acuerdo con las especificaciones del aparato de remoción utilizado para remover el chip de análisis. Por ejemplo, cuando el radio de rotación es pequeño, se puede impartir una aceleración centrífuga grande para aumentar la velocidad de rotación.

El valor del radio de rotación se puede seleccionar adecuadamente en combinación con la velocidad de rotación, de tal modo que se obtenga la aceleración centrífuga deseada. El límite inferior del radio de rotación preferentemente no es menor de 0,1 mm, más preferentemente no es menor de 0,2 mm, aún más preferentemente no es menor de 0,3 mm. Además, el límite superior del radio de rotación es preferentemente de 20 mm o menor, más preferentemente de 10 mm o menor, aún más preferentemente de 5 mm o menor. Por lo tanto, el radio de rotación está comprendido en el intervalo de preferentemente 0,1 a 20 mm, más preferentemente de 0,2 a 10 mm, aún más preferentemente de 0,3 a 5 mm. Cuando el radio de rotación es mayor de 20 mm, dado que la fuerza centrífuga es predominante, el espacio sin llenar con la solución de sustancia a ensayar tiende a ser empujado contra la periferia del hueco, de tal modo que se puede reducir la eficiencia de la remoción y se pueden producir variaciones en la remoción dentro de un hueco. Al mismo tiempo, cuando el radio de rotación es menor de 0,1 mm, dado que la fuerza que actúa en la dirección de la rotación es predominante, el espacio sin llenar con la solución de la sustancia a ensayar tiende a permanecer en la parte central del hueco, de tal modo que se puede reducir la eficiencia de la remoción y se pueden producir variaciones en la remoción.

Además, el valor de la velocidad de rotación se puede asimismo seleccionar adecuadamente en combinación con el radio de rotación, de tal modo que se consiga la aceleración centrífuga deseada, y es preferentemente de 500 rpm a 10.000 rpm, más preferentemente de 750 rpm a 8.000 rpm. Cuanto menor sea el radio de rotación es más preferente, y esto se debe a que el aparato de reacción y el aparato de remoción se pueden reducir de tamaño y por lo tanto el aparato para realizar el procedimiento para remover una solución según la presente invención puede hacerse compacto.

En los casos en que el chip de análisis se hace girar sin montar una tapa sobre el mismo, con el fin de impedir el vertido de la solución de sustancia a ensayar inyectada se utiliza preferentemente un aparato de remoción que tenga un radio de rotación pequeño. Por ejemplo, el radio de rotación es preferentemente de 0,1 mm a 5 mm, más preferentemente de 0,2 mm a 4 mm, aún más preferentemente de 0,3 mm a 3 mm.

El aparato de remoción utilizado en la presente invención para remover el chip de análisis no está limitado particularmente siempre que pueda proporcionar una aceleración centrífuga no menor de $1 \times g$ mediante una combinación de la velocidad de rotación y el radio de rotación. Como producto disponible comercialmente, se puede utilizar preferentemente un agitador de placas, y ejemplos del mismo incluyen: "BioShake 5000 elm", "BioShake 3000-T elm" y "BioShake 3000 elm" (la totalidad de los cuales son fabricados por la firma Q. Instruments GmbH); "Monoshake", "Teleshake" y "Teleshake 1536" (la totalidad de los cuales son fabricados por la firma Thermo Fisher Scientific Inc.); "MS3 basic", "MS3 digital", "VXR basic Vibrax" (marca comercial registrada) y "VORTEX 3" (la totalidad de los cuales son fabricados por la firma IKA); "Micro Plate Shaker N-704" (fabricado por la firma Nissinrika Co., Ltd.); "Plate Shaker KM-M01" (fabricado por la firma Kajjxx Corporation); y "Plate Mixer P-10" (fabricado por la firma Juji Field Inc.). En los casos en que el aparato de remoción está integrado en un sistema automatizado, el

aparato es preferentemente uno cuya velocidad de rotación, tiempo de funcionamiento y similares puedan ser controlados desde el exterior.

En la presente invención, se puede añadir asimismo un elemento de remoción al espacio del interior del hueco o huecos. Los ejemplos del elemento de remoción incluyen partículas (bolitas) y microvarillas, y son particularmente preferentes las partículas. La forma de las partículas y de las microvarillas no está particularmente limitada siempre que permita que las partículas y las microvarillas se desplacen en el interior del hueco o huecos del chip de análisis y remuevan de ese modo la solución que contiene la sustancia a ensayar. En el caso de partículas, éstas pueden tener forma esférica y forma poligonal y, en el caso de microvarillas, éstas pueden tener una forma arbitraria, tal como una forma cilíndrica o una forma prismática; sin embargo, el elemento de remoción tiene preferentemente forma esférica. Además, el tamaño de las partículas tampoco está particularmente limitado; sin embargo, por ejemplo, en el caso de partículas esféricas, su diámetro se puede fijar en el intervalo de 0,1 μm a 1.000 μm y, en vista de la eficiencia de la remoción, el diámetro está más preferentemente en el intervalo de 50 μm a 500 μm . En el caso de microvarillas, su longitud y su diámetro de la superficie inferior se pueden ajustar preferentemente en los intervalos de 50 μm a 5.000 μm y de 10 μm a 300 μm , respectivamente. Desde el punto de vista de la eficiencia de la remoción y similar, se puede seleccionar para su utilización único tipo de partículas o de microvarillas, o se pueden usar en combinación dos o más tipos de partículas o microvarillas.

El material de las partículas y de las microvarillas descritas anteriormente tampoco está limitado particularmente y, por ejemplo, se puede utilizar vidrio, cerámica (por ejemplo circonio parcialmente estabilizado con itrio), metales (por ejemplo oro, platino y acero inoxidable) y plásticos (por ejemplo, náilon y poliestirenos).

El chip de análisis utilizado en la presente invención puede comprender asimismo uno o varios salientes para inmovilizar la sustancia de unión selectiva sobre la superficie superior del mismo. Utilizando en el análisis de la sustancia a ensayar un chip de análisis que tenga dicha estructura, cuando se detecta una señal, el escáner se puede enfocar a la superficie superior del saliente o salientes en los que está inmovilizada la sustancia de unión selectiva, de tal modo que se puede reducir sensiblemente el ruido de detección y se puede mejorar la relación S/R. Además, el chip de análisis utilizado en la presente invención se fabrica preferentemente de un material que pueda reducir la autofluorescencia y, por ejemplo, por lo menos una parte del saliente o salientes en los que se tiene que inmovilizar la sustancia de unión selectiva son preferentemente de color negro.

En la presente invención, se puede utilizar un índice para indicar la sensibilidad de detección de la señal, la relación S/R (relación señal/ruido). En este caso, es preferente que la sensibilidad se estime tomando $S/R = 2$ como límite de detección. En general, se adopta la concentración o cantidad de sustancia a ensayar en la que la relación S/R pasa de 2 a 3 como el límite de detección y, cuando la relación S/R es de 2 o mayor, se puede considerar que se ha obtenido una detección fiable al nivel del límite de detección o mayor (por ejemplo, Makoto Niwa, "Korenara Wakaru Kagakuno Tameno Toukei Shuhou-Tadashii Data no Atsukaikata-", 2008, editado por Kagaku-Dojin Publishing Company, Inc., página 101).

En el procedimiento para remover una solución según la presente invención, dado que el progreso de la reacción selectiva entre una sustancia de unión selectiva inmovilizada en el chip de análisis y la sustancia a ensayar se puede acelerar en comparación con los procedimientos convencionales, la sustancia a ensayar se puede detectar o cuantificar en poco tiempo. Por ejemplo, en la hibridación de ácidos nucleicos, el tiempo de reacción, que convencionalmente requería de 6 a 20 horas, puede ser reducido en gran medida. Por lo tanto, por ejemplo, cuando se lleva a cabo un análisis utilizando un chip de análisis en el área de examen y diagnóstico en el que se requiere analizar rápidamente un gran número de muestras, es preferible utilizar el procedimiento para remover una solución según la presente invención. El procedimiento para remover una solución según la presente invención se puede utilizar preferentemente en el examen y diagnóstico de enfermedades infecciosas, tales como gripe, septicemia y similares. Además, también cuando se procesa una enorme cantidad de muestras en un centro examinador, desde el punto de vista de la reducción de costes, se aplicará preferentemente la presente invención dado que permite llevar a cabo rápidamente el análisis.

EJEMPLOS

La presente invención se describirá en mayor detalle a continuación por medio de ejemplos de la misma. Sin embargo, la presente invención no se limita a los ejemplos siguientes.

Ejemplo de referencia 1

(1) Preparación de un sustrato de chip de análisis

Utilizando un proceso LIGA (Lithographie Galvanoformung Abformung) conocido, se preparó un molde para moldeo por inyección, y se obtuvo mediante moldeo por inyección un sustrato fabricado de polimetilmetacrilato (PMMA), que tenía la forma descrita a continuación. El peso molecular medio del PMMA utilizado fue de 50.000 y se incorporó al PMMA negro de carbón (#3050B, fabricado por Mitsubishi Chemical Corporation) en una cantidad del 1 % en peso para hacer el sustrato resultante de color negro. Cuando se midió la reflectancia espectral y la transmisión espectral

del sustrato negro obtenido de este modo, se encontró que la reflectancia espectral fue del 5 % o menor a cualquier longitud de onda dentro del rango de la luz visible (longitud de onda de 400 nm a 800 nm), y se encontró que la transmisión fue del 0,5 % o menor en el mismo rango de longitudes de onda. Ni la reflectancia espectral ni la transmisión espectral tuvieron un patrón espectral particular (tal como un pico) en el rango de la luz visible y el espectro fue plano uniformemente. En este caso, se midió la reflectancia espectral para la luz reflejada regularmente desde el sustrato utilizando un aparato (CM-2002, fabricado por la firma Minolta Camera Co., Ltd.) equipado con un sistema óptico de recepción de luz de iluminación, de acuerdo con la condición C de JIS Z8722.

El sustrato utilizado en este caso tenía unas dimensiones externas de 76 mm de longitud, 26 mm de anchura y 1 mm de grosor, y un hueco de 6,48 mm de longitud, 6,90 mm de anchura y 0,12 mm de profundidad, hueco en el que se formaron 576 salientes de 0,1 mm de diámetro y 0,12 mm de altura (en adelante, este sustrato se denomina "sustrato A"). En este sustrato A, la diferencia de altura entre las superficies superiores de los salientes y la superficie superior de la parte plana fue de 3 μm o menor. Además, la variación en la altura de las superficies superiores de los salientes fue de 3 μm o menor, y los salientes se formaron a una separación de 0,18 mm.

El sustrato A descrito anteriormente se sumergió en 10 N de solución acuosa de hidróxido sódico durante 12 horas a 70 °C. El sustrato A resultante se lavó secuencialmente con agua pura, 0,1 N de solución acuosa de HCl y agua pura, generando de ese modo grupos carboxilo en la superficie del sustrato.

(2) Inmovilización de la sustancia de unión selectiva

En el sustrato A se inmovilizaron oligonucleótidos como las respectivas sustancias de unión selectiva (ADN de sonda) en las condiciones siguientes. Como oligonucleótidos correspondientes a cuatro genes de a a d, se utilizaron los oligonucleótidos con las secuencias de bases mostradas en SEQ ID NOs: 1 a 4 (fabricados por Operon Biotechnologies Inc.; conjunto de oligonucleótidos para micromatriz de ADN, "Homo sapiens (human) AROS V4.0 (60 bases cada uno)"). Cada uno de estos oligonucleótidos se disolvió en agua pura a una concentración de 0,3 nmol/ μl para preparar soluciones madre. Cuando se distribuyeron en puntos las soluciones madre en el sustrato, cada una de ellas se había diluido 10 veces con PBS (preparado disolviendo 8 g de NaCl, 2,9 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0,2 g de KCl y 0,2 g de KH_2PO_4 totalmente en agua pura, ajustando el volumen a 1 l y ajustando a continuación el pH de la solución resultante a 5,5 con la adición de ácido clorhídrico) hasta una concentración final del ADN de sonda de 0,03 nmol/ μl . Además, para llevar a cabo una condensación entre los grupos carboxilo generados en la superficie del sustrato fabricado de PMMA y el grupo amino terminal del ADN de sonda, se añadió 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) hasta una concentración final de 50 mg/ml. A continuación, utilizando un preparador de matrices (generador de puntos) ("Gene Stamp-II, fabricado por Nippon Laser & Electronics Lab), las soluciones resultantes fueron distribuidas en puntos en las superficies superiores de los salientes del sustrato A para preparar un sustrato en el que la sonda correspondiente al gen a y que tiene la secuencia de base mostrada en SEQ ID NO: 1 fue punteada a N = 4 (en adelante, denominado "chip de análisis 1") y un sustrato en el que las sondas correspondientes a los genes b a d y con las secuencias de base mostradas en SEQ ID NOs: 2 a 4 fueron punteadas cada una a N = 2 (en adelante, denominado "chip de análisis 2"). A continuación, cada uno de los sustratos punteados fue colocado en un recipiente de plástico cerrado de manera estanca y se incubó en condiciones de 37 °C y humedad del 100 % durante aproximadamente 20 horas. Finalmente, los sustratos resultantes se lavaron con agua pura y se secaron por centrifugado utilizando una centrifugadora.

(3) Fijación del elemento de tapa al sustrato de chip de análisis.

A cada uno de los chips de análisis descritos anteriormente 1 y 2 inmovilizados con la sustancia o sustancias de unión selectiva, se fijó un elemento de tapa como sigue. El elemento de tapa se preparó cortando una placa de PMMA. En el elemento de tapa obtenido de este modo se formaron orificios pasantes y cámaras de retención del nivel de líquido. Como elemento adhesivo, se pegó una cinta adhesiva de doble cara sobre el elemento de tapa, de tal modo que la cinta fue laminada a lo largo del margen del elemento de tapa con un grosor de 50 μm , y el elemento de tapa se fijó a continuación a los chips de análisis 1 y 2.

(4) Preparación de la sustancia a ensayar

La sustancia a ensayar se preparó utilizando un ARNa (ARN antisentido) utilizado normalmente como sustancia a ensayar de micromatriz. A partir de 5 μg de ARN total disponible comercialmente obtenido a partir de células humanas cultivadas ("Human Reference RNA", fabricado por la firma Clontech Laboratories, Inc.), se preparó un ARNa utilizando un equipo de preparación de ARNa fabricado por Ambion, "MessageAmp II aRNA Amplification Kit", y este ARNa se marcó con fluorescencia con Cy5 (fabricado por la firma GE Healthcare) para obtener un ARNa marcado con Cy5.

(5) Solución de reacción para hibridación entre la sustancia de unión selectiva y la sustancia a ensayar

En los siguientes ejemplos y en los ejemplos comparativos, salvo que se especifique lo contrario, se utilizó una solución obtenida diluyendo el ARNa marcado, preparado anteriormente con una solución de hibridación que

contiene un 1 % en peso de BSA, 5 × SSC, 0,01 % en peso de ADN de esperma de salmón y un 0,1 % en peso de SDS (todas las concentraciones son concentraciones finales).

Ejemplo 1

5 En una solución que contenía 100 ng del ARNa marcado con Cy5 descrito en el ejemplo de referencia 1, se mezcló la solución de hibridación en un volumen de 25 µl para preparar una solución de sustancia a ensayar. A continuación, 10 µl de la solución de sustancia a ensayar obtenida de este modo se inyectaron en el chip de análisis 1. El espacio del hueco que no se llenó con la solución de sustancia a ensayar tenía un volumen de aproximadamente 3 µl y la proporción del espacio sin llenar con la solución de la sustancia a ensayar en el hueco fue de aproximadamente el 23 %. Se prepararon un total de 6 conjuntos del chip de análisis 1 descrito anteriormente. Estando sellados los orificios de inyección y estando de este modo cerrado herméticamente el hueco, los chips de análisis se colocaron en un aparato de remoción "BioShake 5000" (fabricado por la firma Q. Instruments GmbH; velocidad de rotación máxima: 5.000 rpm, radio de rotación: 0,6 mm), que se colocó en un horno a una temperatura controlada de 37 °C. A continuación, cada uno de los chips de análisis se removió a 5.000 rpm durante 0,5 h, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h ó 16 h para llevar a cabo la reacción. En este proceso, se aplicó una aceleración centrífuga de aproximadamente 17,7×g a cada chip de análisis. En cada uno de los chips de análisis resultantes, se midió la intensidad de la señal (intensidad de fluorescencia) del ARNa marcado hibridado, utilizando un detector de fluorescencia de alta resolución ("3D-Gene (marca comercial registrada) Scanner", fabricado por la firma Toray Industries, Inc.). Los resultados se muestran en las figuras 9 y 10 y en la tabla 1. Se detectó una señal con una intensidad del valor umbral (promedio de puntos en blanco + 2SD) o mayor, 0,5 h después del inicio de la reacción; por lo tanto, se mostró que la reacción tuvo lugar rápidamente.

Ejemplo 2

25 La solución de la sustancia a ensayar se inyectó en los chips de análisis 1 (6 conjuntos) del mismo modo que en el ejemplo 1. Los chips de análisis resultantes se colocaron en un aparato de remoción "BioShake 5000", que se colocó en un horno a una temperatura controlada de 37 °C, y a continuación se removió cada uno a 3.000 rpm durante 0,5 h, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h ó 16 h para llevar a cabo la reacción. En este proceso, se aplicó una aceleración centrífuga de aproximadamente 6,04×g a cada chip de análisis. En cada uno de los chips de análisis, se midió la intensidad de la señal (intensidad de fluorescencia) del ARNa marcado hibridado, utilizando un detector de fluorescencia de alta resolución. Los resultados se muestran en las figuras 9 y 10 y en la tabla 1. Se detectó una señal con una intensidad de un valor umbral o superior, 0,5 h después del inicio de la reacción; por lo tanto, se mostró que la reacción tuvo lugar rápidamente.

Ejemplo 3

35 La solución de la sustancia a ensayar se inyectó en los chips de análisis 1 (6 conjuntos) del mismo modo que en el ejemplo 1. Los chips de análisis resultantes se colocaron en un aparato de remoción "MS3 digital" (fabricado por la firma IKA; velocidad de rotación máxima: 3.000 rpm; radio de rotación: 2,25 mm), que se colocó en un horno a una temperatura controlada de 37 °C, y a continuación se removió cada uno a 3.000 rpm durante 0,5 h, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h ó 16 h para llevar a cabo la reacción. En este proceso, se aplicó una aceleración centrífuga de aproximadamente 22,6×g a cada chip de análisis. En cada uno de los chips de análisis, se midió la intensidad de la señal (intensidad de fluorescencia) del ARNa marcado hibridado, utilizando un detector de fluorescencia de alta resolución. Los resultados se muestran en las figuras 9 y 10 y en la tabla 1. Se detectó una señal con una intensidad de un valor umbral o superior 0,5 h después del inicio de la reacción; por lo tanto, se mostró que la reacción tuvo lugar rápidamente.

Ejemplo 4

50 La solución de la sustancia a ensayar se inyectó en los chips de análisis 1 (6 conjuntos) del mismo modo que en el ejemplo 1. Los chips de análisis resultantes se colocaron en un aparato de remoción "MS3 digital", que se colocó en un horno a una temperatura controlada de 37 °C, y a continuación se removió cada uno a 1.000 rpm durante 0,5 h, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h ó 16 h para llevar a cabo la reacción. En este proceso, se aplicó una aceleración centrífuga de aproximadamente 2,52×g a cada chip de análisis. En cada uno de los chips de análisis, se midió la intensidad de la señal (intensidad de fluorescencia) del ARNa marcado hibridado, utilizando un detector de fluorescencia de alta resolución. Los resultados se muestran en las figuras 9 y 10 y en la tabla 1. Se detectó una señal con una intensidad de un valor umbral o superior 0,5 h después del inicio de la reacción; por lo tanto, se mostró que la reacción tuvo lugar rápidamente.

Ejemplo comparativo 1

60 La solución de la sustancia a ensayar se inyectó en los chips de análisis 1 (6 conjuntos) del mismo modo que en el ejemplo 1. Los chips de análisis resultantes se colocaron en un aparato de remoción "BioShake 5000", que se colocó en un horno a una temperatura controlada de 37 °C, y a continuación se removió cada uno a 1,000 rpm durante 0,5 h, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h ó 16 h para llevar a cabo la reacción. En este proceso, se aplicó una aceleración centrífuga de

aproximadamente 0,671×g a cada chip de análisis. En cada uno de los chips de análisis, se midió la intensidad de la señal (intensidad de fluorescencia) del ARNa marcado hibridado, utilizando un detector de fluorescencia de alta resolución. Los resultados se muestran en las figuras 9 y 10 y en la tabla 1. A las 0,5 h después del inicio de la reacción, no se detectó ninguna señal con una intensidad de un valor umbral o superior. Se detectó una señal con una intensidad del valor umbral o superior, transcurrida 1 h después del inicio de la reacción.

Ejemplo comparativo 2

La solución de la sustancia a ensayar se inyectó en los chips de análisis 1 (6 conjuntos) del mismo modo que en el ejemplo 1. Los chips de análisis resultantes se colocaron en un aparato de remoción "BioShake 5000", que se colocó en un horno a una temperatura controlada de 37 °C, y a continuación se removió cada uno a 250 rpm durante 0,5 h, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h ó 16 h para llevar a cabo la reacción. En este proceso, se aplicó una aceleración centrífuga de aproximadamente 0,042×g a cada chip de análisis. En cada uno de los chips de análisis, se midió la intensidad de la señal (intensidad de fluorescencia) del ARNa marcado hibridado, utilizando un detector de fluorescencia de alta resolución. Los resultados se muestran en las figuras 9 y 10 y en la tabla 1. A las 0,5 h después del inicio de la reacción, no se detectó ninguna señal con una intensidad de un valor umbral o superior. Se detectó una señal con una intensidad del valor umbral o superior, transcurrida 1 h después del inicio de la reacción.

Ejemplo comparativo 3

La solución de la sustancia a ensayar se inyectó en los chips de análisis 1 (6 conjuntos) del mismo modo que en el ejemplo 1. Los chips de análisis resultantes se colocaron en un aparato de remoción "MS3 digital", que se colocó en un horno a una temperatura controlada de 37 °C, y a continuación se removió cada uno a 250 rpm durante 0,5 h, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h ó 16 h para llevar a cabo la reacción. En este proceso, se aplicó una aceleración centrífuga de aproximadamente 0,157×g a cada chip de análisis. En cada uno de los chips de análisis, se midió la intensidad de la señal (intensidad de fluorescencia) del ARNa marcado hibridado, utilizando un detector de fluorescencia de alta resolución. Los resultados se muestran en las figuras 9 y 10 y en la tabla 1. A las 0,5 h después del inicio de la reacción, no se detectó ninguna señal con una intensidad de un valor umbral o superior. Se detectó una señal con una intensidad del valor umbral o superior, transcurrida 1 h después del inicio de la reacción.

[Tabla 1]

Tiempo de reacción e intensidad de la señal						
Tiempo de reacción (h)	0,5	1	2	4	8	16
Ejemplo 1	52,5	97,8	182,5	232,3	285,5	309,0
Ejemplo 2	41,3	85,5	171,3	218,3	279,2	305,4
Ejemplo 3	61,7	101,9	192,1	247,9	296,4	312,3
Ejemplo 4	35,3	67,5	150,9	193,5	265,4	296,4
Ejemplo comparativo 1	22,8	35,3	71,2	136,7	207,2	286,4
Ejemplo comparativo 2	17,8	31,2	62,9	108,3	176,1	279,0
Ejemplo comparativo 3	20,5	33,9	76,8	145,4	218,9	272,9

Ejemplo 5

En una solución que contenía 60 ng de ARNa marcado con Cy5 descrita en el ejemplo de referencia 1 se mezcló la solución de hibridación a un volumen de 10 µl, y se inyectaron 6,7 µl de la solución resultante en los chips de análisis 2 (2 conjuntos). La cantidad de ARNa inyectado marcado con Cy5 fue de 40 ng, que es la misma que en los ejemplos 1 a 4. El espacio del hueco que no se llenó con la solución de la sustancia a ensayar tenía un volumen de aproximadamente 6,3 µl y la proporción del espacio sin llenar con la solución de la sustancia a ensayar con respecto a todo el hueco fue de aproximadamente el 48 %. Del mismo modo que en el ejemplo 1, los chips de análisis se colocaron en un aparato de remoción "BioShake 5000" y se removieron a 5.000 rpm durante 1 hora para llevar a cabo la reacción. En cada uno de los chips de análisis, se midieron las intensidades de señal (intensidades de fluorescencia) del ARNa marcado que hibridó los tres genes de b a d, utilizando un detector de fluorescencia de alta resolución. Los resultados se muestran en la tabla 2. Después de 1 hora de tiempo de reacción, las señales de todos los genes tuvieron una intensidad del valor umbral o superior y por lo tanto fueron efectivas.

Ejemplo 6

En una solución que contenía 60 ng de ARNa marcado con Cy5 descrita en el ejemplo de referencia 1 se mezcló la solución de hibridación a un volumen de 15 µl, y se inyectaron 10 µl de la solución resultante en los chips de análisis 2 (2 conjuntos). La cantidad de ARNa inyectado marcado con Cy5 fue de 40 ng, que es la misma que en los ejemplos 1 a 4. El espacio del hueco que no se llenó con la solución de la sustancia a ensayar tuvo un volumen de aproximadamente 6,3 µl y la proporción del espacio sin llenar con la solución de la sustancia a ensayar con respecto a todo el hueco fue de aproximadamente el 23 %. Del mismo modo que en el ejemplo 1, los chips de análisis se colocaron en un aparato de remoción "BioShake 5000" y se removieron a 5.000 rpm durante 1 hora para llevar a cabo la reacción. En cada uno de los chips de análisis, se midieron las intensidades de señal (intensidades de

fluorescencia) del ARNa marcado que hibridó los tres genes de b a d, utilizando un detector de fluorescencia de alta resolución. Los resultados se muestran en la tabla 2. Después de 1 hora de tiempo de reacción, las señales de todos los genes tuvieron una intensidad del valor umbral o superior y por lo tanto fueron efectivas.

5 Ejemplo comparativo 4

10 En una solución que contenía 60 ng del ARNa marcado con Cy5 descrita en el ejemplo de referencia 1, se mezcló la solución de hibridación a un volumen de 20 µl, y se inyectaron 13 µl de la solución resultante en los chips de análisis 2 (2 conjuntos) para llenar el hueco de cada chip de análisis (la proporción del espacio sin llenar con la solución de la sustancia a ensayar con respecto a todo el hueco fue del 0 %). Del mismo modo que en el ejemplo 1, los chips de análisis se colocaron en un aparato de remoción "BioShake 5000" y se removieron a 5.000 rpm durante 1 hora para llevar a cabo la reacción. En cada uno de los chips de análisis, se midieron las intensidades de señal del ARNa marcado que hibridó los tres genes de b a d, utilizando un detector de fluorescencia de alta resolución. Los resultados se muestran en la tabla 2. Después de 1 hora de tiempo de reacción, la señal del gen b tuvo una intensidad del valor umbral o superior y por lo tanto fue efectiva; sin embargo, la intensidad de la señal fue más débil que las medidas en los ejemplos 5 y 6. Además, las intensidades de señal de los genes c y d fueron menores que el valor umbral y por lo tanto no válidas.

[Tabla 2]

Proporción del espacio sin llenar con la solución de la sustancia a ensayar en los huecos e intensidad de la señal de cada gen			
	Ejemplo 5	Ejemplo 6	Ejemplo comparativo 4
Proporción del espacio sin llenar con la solución de la sustancia a ensayar en el hueco	48	23	0
Gen b	430,3	361,0	151,6
	432,2	343,9	155,4
Gen c	139,3	129,2	107,6
	147,3	132,5	107,6
Gen d	148,7	126,3	99,9
	150,6	136,5	101,7
Valor umbral (promedio + 2SD)	111,0	107,7	108,8

20 Ejemplo de referencia 2

(1) Preparación del sustrato del chip de análisis

25 Utilizando el mismo material que el utilizado en el ejemplo de referencia 1, se preparó mediante moldeo por inyección un sustrato con dimensiones externas de 76 mm de longitud, 26 mm de anchura y 2,5 mm de grosor. En este sustrato, se formaron cuatro huecos elípticos con un lado largo de 4,8 mm, un lado corto de 2,40 mm y una profundidad de 1,5 mm y, en cada uno de los huecos, se formaron 98 salientes de 0,1 mm de diámetro y 0,12 mm de altura (en adelante, este sustrato se denomina "sustrato B"). En este sustrato B, el volumen de los huecos fue de aproximadamente 13,5 µl. La diferencia en altura entre las superficies superiores de los salientes y la superficie superior de la parte plana, y la variación en altura de las superficies superiores de los salientes fueron ambas de 3 µm o menores. Además, los salientes se formaron a una separación de 0,18 mm.

35 (2) Inmovilización de la sustancia de unión selectiva (sonda de captura).

Mediante el mismo procedimiento de preparación que en el ejemplo de referencia 1, como sustancia de unión selectiva (sonda de captura), se sintetizó un oligonucleótido modificado con un grupo amino en el extremo 5', que se describió en un artículo que presentaba la investigación en la diferenciación de los tipos de virus de papiloma humano (J. Clin. Microbiol., 1995, páginas 901 a 905) y tenía la secuencia de base mostrada en SEQ ID NO: 5 (una secuencia complementaria a una parte de la secuencia de la región del gen L1 del virus de papiloma humano de tipo 16, que se utilizó como sustancia a ensayar). El oligonucleótido obtenido de este modo fue distribuido en puntos e inmovilizado en 22 de los 98 salientes del sustrato B para obtener un chip de análisis (en adelante, denominado "chip de análisis 3").

45 (3) Preparación de la sustancia a ensayar

Como sustancia a ensayar, se sometió a fragmentación ultrasónica un plásmido recombinante adquirido en el banco de recursos de investigación de ciencias de la salud (Health Science Research Resources Bank) (pHPV16 (longitud total: 16.600 pares de bases), en el que se clonó ADN genómico del virus de papiloma humano. El resultado se diluyó con 1 x solución de hibridación (1 % en peso de albúmina de suero bovino (BSA, bovine serum albumin), 5 x SSC, 1 % en peso de dodecilsulfato sódico (SDS, sodium dodecyl sulfate), 50 ng/ml de solución de ADN de esperma

de salmón, 5 % en peso de dextrano sulfato de sodio y 30 % de formamida) a una concentración de ácido nucleico de 0,1 amol/μl, preparando de ese modo una solución de ADN de muestra.

(4) Preparación de soluciones de sonda de detección

Como sonda de detección para utilizar en hibridación en sándwich, se sintetizó MY11 (SEQ ID NO: 6; basada en la posición base del extremo 5' cuando la sustancia a ensayar se unió con la sonda de captura, una secuencia complementaria a las bases 50-ésima a 69-ésima en el lado del extremo 5'), GP5 (SEQ ID NO: 7; de manera similar a MY11, una secuencia complementaria a las bases 10-ésima a 34-ésima en el lado del extremo 5'), GP6 (SEQ ID NO: 8; basada en la posición base del extremo 3' cuando la sustancia a ensayar se unió con la sonda de captura, una secuencia complementaria a las bases 60-ésima a 82-ésima en el lado del extremo 3') y MY09 (SEQ ID NO: 9; de manera similar a GP6, una secuencia complementaria a las bases 340-ésima a 359-ésima en el lado del extremo 3'), la totalidad de las cuales se marcaron con biotina en el extremo 3' y el extremo 5'. Cada una de estas sondas de detección se diluyó con agua esterilizada a una concentración de 100 fmol para preparar soluciones de sonda de detección.

Ejemplo 7

A 1 μl de la solución de ADN de muestra descrita en el ejemplo de referencia 2, se añadió y se mezcló 1 μl de cada una de las soluciones de sonda de detección descritas en el ejemplo de referencia 2, y la mezcla resultante se calentó en un termociclador a 95 °C durante 5 minutos. Después de dejar reposar la mezcla hasta que se enfrió a temperatura ambiente, se añadieron a la misma 8 μl de 1 × solución de hibridación descrita en el ejemplo de referencia 2 y se mezclaron, preparando de ese modo cada solución de hibridación que contenía la sustancia a ensayar. La cantidad íntegra de las respectivas soluciones de hibridación que contenían la sustancia a ensayar se inyectó en uno de los huecos del chip de análisis 3 y la abertura se selló con una película de PET recubierta con un adhesivo acrílico. En este caso, el espacio del hueco que no se llenó con la solución tenía un volumen de aproximadamente 3,5 μl, y la proporción del espacio sin llenar con la solución en el hueco fue de aproximadamente el 26 %. Se llevó a cabo la detección de la sustancia a ensayar mediante un procedimiento de hibridación en sándwich. Los chips de análisis se colocaron en un aparato de remoción "BioShake 5000" (fabricado por la firma Q. Instruments GmbH), que se colocó en un horno a una temperatura controlada de 32 °C, y se removieron a 3.000 rpm durante 2 horas para permitir que la sonda de captura y la sustancia a ensayar experimentaran una reacción de hibridación. En este proceso, se aplicó una aceleración centrífuga de aproximadamente 6,04×g a cada chip de análisis. Después de la reacción, el cierre estanco que cubría la abertura se retiró y los chips de análisis se lavaron durante 5 minutos con una solución de lavado A calentada a 30 °C (0,5 × SSC y 1 % en peso de SDS). Después de secar los chips de análisis, se añadieron gota a gota al hueco 10 μl de una solución de estreptavidina ficoeritrina de 50 ng/μl, que se preparó mezclando un reactivo de tinte (estreptavidina ficoeritrina) y un diluyente (100 mM de MES, 1M de NaCl, 0,05 % en peso de Tween 20 y 2 mg/ml BSA), y los chips de análisis se incubaron en la oscuridad a 35 °C durante 5 minutos. A continuación, los chips de análisis se lavaron durante 5 minutos con una solución de lavado B calentada a 30 °C (6 × SSPE y 0,01 % en peso de Tween 20) y a continuación se secaron. La intensidad de la señal (intensidad de fluorescencia) se midió utilizando un detector de fluorescencia de alta resolución ("3D-Gene (marca comercial registrada) Scanner", fabricado por la firma Toray Industries, Inc.). Se leyeron los valores de los salientes en los que la sustancia de unión selectiva estaba inmovilizada (señal) y de los salientes en los que la sustancia de unión selectiva no estaba inmovilizada (ruido) con el fin de calcular la relación señal/ruido (relación S/R). Los resultados se muestran en la tabla 3. La relación S/R fue de 2,80, que fue mayor que el límite de detección de S/R = 2.

Ejemplo 8

Se llevaron a cabo las mismas operaciones que en el ejemplo 7, excepto que la velocidad de rotación del aparato de remoción en el momento de llevar a cabo la reacción de hibridación se modificó a 5.000 rpm. En este caso, la aceleración centrífuga fue de 16,77×g. El resultado de calcular la relación S/R se muestra en la tabla 3. La relación S/R fue de 2,53, que fue mayor que el límite de detección de S/R = 2.

Ejemplo comparativo 5

Se llevaron a cabo las mismas operaciones que en el ejemplo 7, excepto que la velocidad de rotación del aparato de remoción en el momento de llevar a cabo la reacción de hibridación se modificó a 1,000 rpm. En este caso, la aceleración centrífuga fue de 0,67×g. El resultado de calcular la relación S/R se muestra en la tabla 3. La relación S/R fue de 1,56, que fue menor que el límite de detección de S/R = 2.

Ejemplo 9

Se llevaron a cabo las mismas operaciones que en el ejemplo 7, excepto que se utilizó un "Mix-EVR" (fabricado por la firma Taitec Corporation; máxima velocidad de rotación: 2.500 rpm; radio de rotación: 1 mm) como aparato de remoción, y la velocidad de rotación del mismo en el momento de llevar a cabo la reacción de hibridación se ajustó a

2.000 rpm. En este caso, la aceleración centrífuga fue de $4,47 \times g$. El resultado de calcular la relación S/R se muestra en la tabla 3. La relación S/R fue de 2,24, que fue mayor que el límite de detección de $S/R = 2$.

Ejemplo 10

5 Se llevaron a cabo las mismas operaciones que en el ejemplo 9, excepto que la velocidad de rotación del aparato de remoción en el momento de llevar a cabo la reacción de hibridación se modificó a 2,500 rpm. En este caso, la aceleración centrífuga fue de $6,99 \times g$. El resultado de calcular la relación S/R se muestra en la tabla 3. La relación S/R fue de 2,76, que fue mayor que el límite de detección de $S/R = 2$.

10 Ejemplo comparativo 6

15 Se llevaron a cabo las mismas operaciones que en el ejemplo 9, excepto que la velocidad de rotación del aparato de remoción en el momento de llevar a cabo la reacción de hibridación se modificó a 500 rpm. En este caso, la aceleración centrífuga fue de $0,28 \times g$. El resultado de calcular la relación S/R se muestra en la tabla 3. La relación S/R fue de 1,48, que fue menor que el límite de detección de $S/R = 2$.

Ejemplo 11

20 Se llevaron a cabo las mismas operaciones que en el ejemplo 7, excepto que se utilizó "MS3 digital" (fabricado por la firma IKA) como aparato de remoción y la velocidad de rotación del mismo en el momento de llevar a cabo la reacción de hibridación se ajustó a 2.000 rpm. En este caso, la aceleración centrífuga fue de $10,06 \times g$. El resultado de calcular la relación S/R se muestra en la tabla 3. La relación S/R fue de 3,25, que fue mayor que el límite de detección de $S/R = 2$.

25 Ejemplo 12

30 Se llevaron a cabo las mismas operaciones que en el ejemplo 10, excepto que la velocidad de rotación del aparato de remoción en el momento de llevar a cabo la reacción de hibridación se modificó a 3,000 rpm. En este caso, la aceleración centrífuga fue de $22,64 \times g$. El resultado de calcular la relación S/R se muestra en la tabla 3. La relación S/R fue de 2,72, que fue mayor que el límite de detección de $S/R = 2$.

Ejemplo comparativo 7

35 Se llevaron a cabo las mismas operaciones que en el ejemplo 11, excepto que la velocidad de rotación del aparato de remoción en el momento de llevar a cabo la reacción de hibridación se modificó a 500 rpm. En este caso, la aceleración centrífuga fue de $0,63 \times g$. El resultado de calcular la relación S/R se muestra en la tabla 3. La relación S/R fue de 1,61, que fue menor que el límite de detección de $S/R = 2$.

40 Ejemplo 13

45 Se llevaron a cabo las mismas operaciones que en el ejemplo 7, excepto que se utilizó un aparato de remoción fabricado (máxima velocidad de rotación: 1.000 rpm; radio de rotación: 5 mm) y la velocidad de rotación del mismo en el momento de llevar a cabo la reacción de hibridación se ajustó a 1.000 rpm. En este caso, la aceleración centrífuga fue de $5,59 \times g$. El resultado de calcular la relación S/R se muestra en la tabla 3. La relación S/R fue de 2,39, que fue mayor que el límite de detección de $S/R = 2$.

Ejemplo comparativo 8

50 Se llevaron a cabo las mismas operaciones que en el ejemplo 13, excepto que la velocidad de rotación del aparato de remoción en el momento de llevar a cabo la reacción de hibridación se modificó a 250 rpm. En este caso, la aceleración centrífuga fue de $0,35 \times g$. El resultado de calcular la relación S/R se muestra en la tabla 3. La relación S/R fue de 1,49, que fue menor que el límite de detección de $S/R = 2$.

55 Ejemplo comparativo 9

60 Se llevaron a cabo las mismas operaciones que en el ejemplo 7, excepto en que se utilizó un "Multi Shaker MMS-210" (fabricado por la firma Tokyo Rikakikai Co., Ltd.; máxima velocidad de rotación: 250 rpm; radio de rotación: 12,5 mm) como aparato de remoción, y la velocidad de rotación del mismo en el momento de llevar a cabo la reacción de hibridación se ajustó a 250 rpm. En este caso, la aceleración centrífuga fue de $0,87 \times g$. El resultado de calcular la relación S/R se muestra en la tabla 3. La relación S/R fue de 1,56, que fue menor que el límite de detección de $S/R = 2$.

Ejemplo comparativo 10

Se llevaron a cabo las mismas operaciones que en el ejemplo 7, excepto que se utilizó un aparato de remoción fabricado (máxima velocidad de rotación: 1.000 rpm; radio de rotación: 24 mm) y la velocidad de rotación del mismo en el momento de llevar a cabo la reacción de hibridación se ajustó a 100 rpm. En este caso, la aceleración centrífuga fue de 0,27×g. El resultado de calcular la relación S/R se muestra en la tabla 3. La relación S/R fue de 1,39, que fue menor que el límite de detección de S/R = 2.

Ejemplo comparativo 11

Se llevaron a cabo las mismas operaciones que en el ejemplo 7, excepto que se utilizó un aparato de remoción fabricado (máxima velocidad de rotación: 1.000 rpm; radio de rotación: 72 mm) y la velocidad de rotación del mismo en el momento de llevar a cabo la reacción de hibridación se ajustó a 100 rpm. En este caso, la aceleración centrífuga fue de 0,80×g. El resultado de calcular la relación S/R se muestra en la tabla 3. La relación S/R fue de 1,57, que fue menor que el límite de detección de S/R = 2.

[Tabla 3]

Radio de rotación, velocidad de rotación, aceleración centrífuga e intensidad de la señal						
	Radio de rotación (mm)	Velocidad de rotación (rpm)	Aceleración centrífuga (×g)	Intensidad de la señal		
				Señal	Ruido	Relación S/R
Ejemplo comparativo 5	0,6	1.000	0,67	2.841	1.821	1,56
Ejemplo 7	0,6	3.000	6,04	5.110	1.825	2,80
Ejemplo 8	0,6	5.000	16,77	4.625	1.828	2,53
Ejemplo comparativo 6	1	500	0,28	2.700	1.824	1,48
Ejemplo 9	1	2.000	4,47	4.036	1.802	2,24
Ejemplo 10	1	2.500	6,99	5.029	1.822	2,76
Ejemplo comparativo 7	2,25	500	0,63	2.924	1.816	1,61
Ejemplo 11	2,25	2.000	10,06	5.879	1.809	3,25
Ejemplo 12	2,25	3.000	22,64	4.967	1.826	2,72
Ejemplo comparativo 8	5	250	0,35	2.713	1.821	1,49
Ejemplo 13	5	1.000	5,59	4.338	1.815	2,39
Ejemplo comparativo 9	12,5	250	0,87	2.838	1.819	1,56
Ejemplo comparativo 10	24	100	0,27	2.538	1.826	1,39
Ejemplo comparativo 11	72	100	0,80	2.820	1.796	1,57

Ejemplo 14

A 4 µl de la solución de ADN de muestra descrita en el ejemplo de referencia 2, se añadieron y se mezclaron 4 µl de cada una de las soluciones de sonda de detección descritas en el ejemplo de referencia 2, y la mezcla resultante se calentó en un termociclador a 95 °C durante 5 minutos. Después de dejar reposar la mezcla hasta que se enfrió a temperatura ambiente, se añadieron a la misma 32 µl de 1 × solución de hibridación descrita en el ejemplo de referencia 2 y se mezclaron, preparando de ese modo cada solución de hibridación que contenía la sustancia a ensayar. En cada uno de los cuatro huecos (huecos números 1 a 4) del chip de análisis 3, se inyectaron 10 µl de cada solución que contenía la sustancia a ensayar y las aberturas se sellaron con una película de PET recubierta con un adhesivo acrílico. En este caso, el espacio de cada hueco que no se llenó con la solución tenía un volumen de aproximadamente 3,5 µl, y la proporción del espacio sin llenar con la solución en cada hueco fue de aproximadamente el 26 %. Se llevó a cabo la detección de la sustancia a ensayar mediante un procedimiento de hibridación en sándwich. El chip de análisis se colocó en un aparato de remoción "MS3 digital" (fabricado por la firma IKA), que se colocó en un horno a una temperatura controlada de 32 °C, y se removió a 2.000 rpm durante 2 horas para permitir que la sonda de captura y la sustancia a ensayar experimentaran una reacción de hibridación. En este proceso, se aplicó una aceleración centrífuga de aproximadamente 10,1×g al chip de análisis. Después de la reacción, el cierre estanco que cubría las aberturas se retiró y los chips de análisis se lavaron durante 5 minutos con una solución de lavado A calentada a 30 °C (0,5 × SSC y 1 % en peso de SDS). Después de secar el chip de análisis, se añadieron gota a gota a cada hueco 10 µl de una solución de estreptavidina ficoeritrina de 50 ng/µl, que se preparó mezclando un reactivo de tinte (estreptavidina ficoeritrina) y un diluyente (100 mM de MES, 1M de NaCl, 0,05 % en peso de Tween 20 y 2 mg/ml BSA), y el chip de análisis se incubó en la oscuridad a 35 °C durante 5 minutos. A continuación, el chip de análisis se lavó durante 5 minutos con la solución de lavado B calentada a 30

5 °C (6 × SSPE y 0,01 % en peso de Tween 20) y a continuación se secó. La intensidad de la señal (intensidad de fluorescencia) se midió utilizando un detector de fluorescencia de alta resolución ("3D-Gene (marca comercial registrada) Scanner", fabricado por la firma Toray Industries, Inc.). Se leyeron los valores de los salientes en los que se inmovilizó la sustancia de unión selectiva (señal) y de los salientes en los que no se inmovilizó la sustancia de unión selectiva (ruido) con el fin de calcular la relación señal/ruido (relación S/R) para cada uno de los cuatro huecos (huecos números 1 a 4). Los resultados se muestran en la tabla 4. Se encontró que la relación S/R valía 2,9, 2,7, 2,8 y 2,8 para los huecos números 1 a 4, respectivamente, valores que fueron todos ellos mayores que el límite de detección de S/R = 2. Además, los valores CV de las señales de los 22 puntos sobresalientes en los huecos respectivos fueron todos menores del 10 %, y la variación de la señal dentro de cada hueco fue pequeña. Además, el valor CV de las señales de la totalidad de los cuatro huecos (88 señales) fue asimismo pequeño, del 7,5 %; por lo tanto, se mostró que la variación entre los huecos fue asimismo pequeña.

Ejemplo comparativo 12

15 Se llevaron a cabo las mismas operaciones que en el ejemplo 14, excepto que se utilizó un aparato de remoción de tipo revolución rotatoria fabricado (radio de revolución: 72 mm) y la velocidad de revolución se ajustó a 350 rpm. En este caso, la aceleración centrífuga fue de 9,9×g. Los resultados de calcular la relación S/R para los cuatro huecos (huecos números 1 a 4) se muestran en la tabla 4. La relación S/R fue de 1,8, 1,9, 1,7 y 1,5 para los cuatro huecos, respectivamente, valores que fueron todos ellos menores que el límite de detección de S/R = 2. Además, los valores CV de las señales de los 22 puntos sobresalientes en los huecos respectivos fueron variables en torno al 10 %, y el valor CV de las señales de la totalidad de los cuatro huecos (88 señales) fue elevado, del 15,3 %; por lo tanto, se mostró que la variación entre los huecos fue grande.

[Tabla 4]

Modo de rotación de la remoción, intensidad de la señal, variación y relación S/R									
		Ejemplo 14				Ejemplo comparativo 12			
Modo de rotación		Rotación				Rotación y revolución			
Radio de rotación		2,25 mm				72 mm			
Velocidad de rotación		2.000 rpm				350 rpm			
Aceleración centrífuga		10,1×g				9,9×g			
Hueco N°.		#1	#2	#3	#4	#1	#2	#3	#4
Señal de cada hueco	Promedio	5.395	5.273	5.262	5.132	3.322	3.566	3.018	2.747
	Desviación estándar	453	339	452	302	299	283	297	476
	CV (%)	8,4	6,4	8,6	5,9	9,0	7,9	9,9	10,8
Señal global	Promedio	5.266				3.112			
	Desviación estándar	396,6				475,6			
	CV (%)	7,5				15,3			
Promedio de ruido de cada hueco		1.874	1.938	1.859	1.862	1.820	1.847	1.757	1.777
Relación S/R		2,9	2,7	2,8	2,8	1,8	1,9	1,7	1,5

25 APLICABILIDAD INDUSTRIAL

30 El procedimiento para remover una solución según la presente invención puede, comparado con los anteriores, acortar en gran medida el tiempo necesario para la detección o cuantificación de una sustancia a ensayar utilizando un chip de análisis, tal como un chip de ADN. Por lo tanto, la presente invención es útil dado que permite un rápido diagnóstico, examen y similares de enfermedades en la práctica clínica así como en centros examinadores.

DESCRIPCIÓN DE LOS SÍMBOLOS

- 35 1: Sustrato
- 2: Material de placa con uno o varios orificios pasantes
- 3: Superficie inferior del hueco
- 4: Superficie de la pared del hueco
- 5: Superficie de la sustancia de unión selectiva inmovilizada
- 40 6: Hueco (o espacio hueco)
- 7: Tapa
- 8: Orificio de inyección
- 9: Espacio (o burbuja de aire) no lleno con la solución
- 45 10: Chip de análisis

[LISTA DE SECUENCIAS]

LISTA DE SECUENCIAS

[0108]

<110> Toray Industries, Inc.

<120> Procedimiento para remover una solución

<130> 13059

<160> 9

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 69

<212>ADN

<213> Homo sapiens

<400> 1

tgaagagggg aggggcctag ggagccgcac cttgtcatgt accatcaata agtaccctg 60

tgctcaacc 69

<210> 2

<211> 69

<212>ADN

<213> Homo sapiens

<400> 2

aactagctgc caaacaactt caaccctgt aattcatgta catttgcaac agccagcccg 60

gtacagcct 69

<210> 3

<211> 70

<212>ADN

ES 2 623 098 T3

<213> Homo sapiens

<400> 3

gctgctttct gaccaaagt tttccatct gtgtacagct ccagctgttt gaagagaggg 60

aacaacacgg 70

<210> 4

<211> 69

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 4

gaagggctcg catcatccag gaaagaattc agcagaagtt cacttttttt cttattcaaa 60

gagtctgga 69

<210> 5

<211> 30

<212> ADN

<213> Papilomavirus humano tipo 16

<400> 5

atccgtaact acatctcca catacaccaa 30

<210> 6

<211> 20

<212> ADN

<213> Papilomavirus humano

<220>

<221> misc_feature

<222> (1) .. (1)

<223> base biotinilada

<220>

<221> misc_feature

<222> (20)..(20)

<223> base biotinilada

<400> 6

gcacagggac ataaaaatgg 20

<210> 7

<211> 25

<212> ADN

<213> Papilomavirus humano

<220>

<221> misc_feature

<222> (1) .. (1)

<223> base biotinilada

<220>

<221> misc_feature
<222> (25) .. (25)
<223> base biotinilada

<400> 7
gaaaaataaa ctgtaaatca tattc 25

<210> 8
<211> 23
<212> ADN
<213> Papilomavirus humano

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> base biotinilada

<220>
<221> misc_feature
<222> (23) .. (23)
<223> base biotinilada

<400> 8
ttgttactg tggtagatac tac 23

<210> 9
<211> 20
<212> ADN
<213> Papilomavirus humano

<220>
<221> misc_feature
<222> (1) .. (1)
<223> base biotinilada

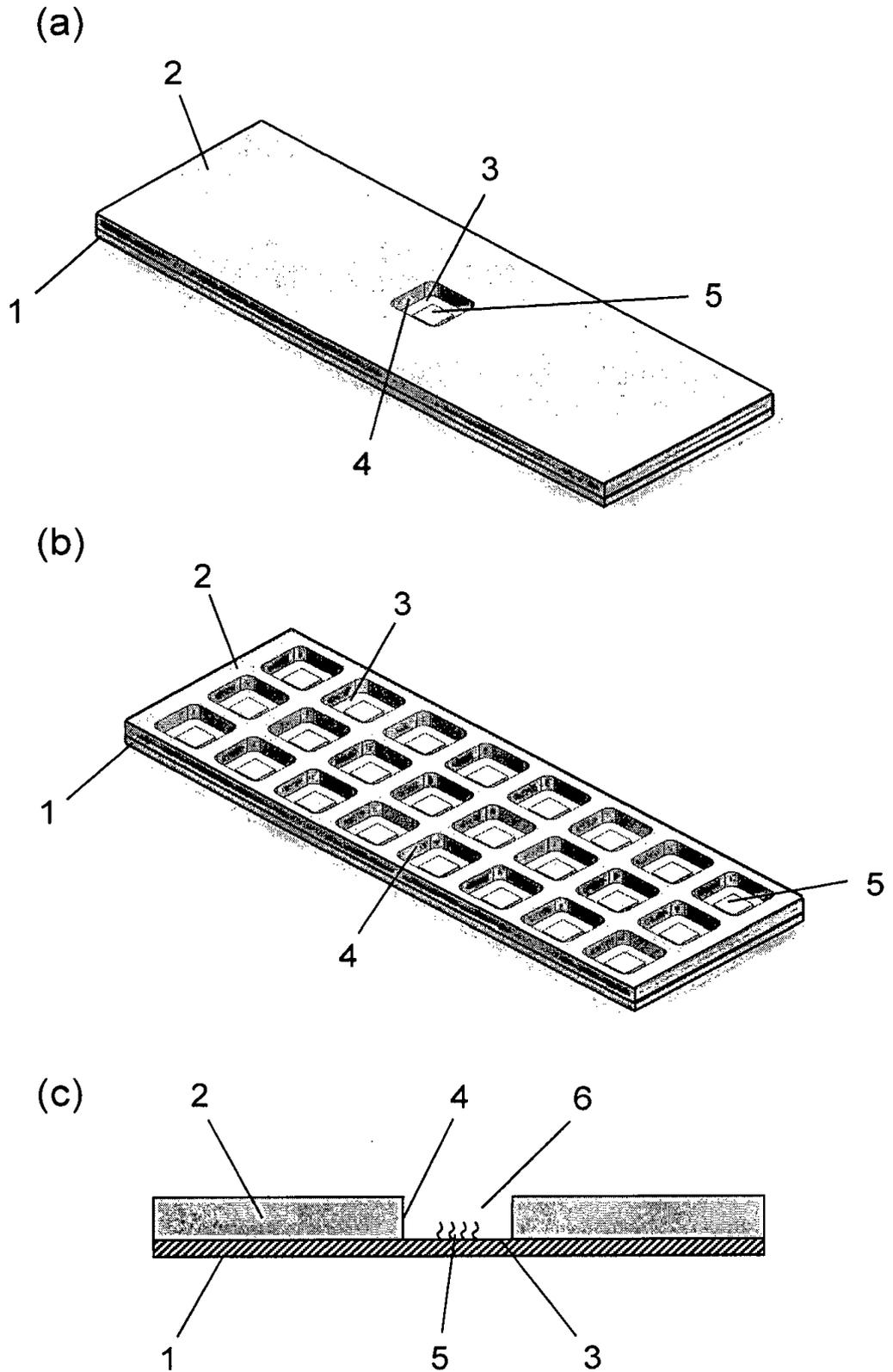
<220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(20)
<223> base biotinilada

<400> 9
gatcagtatc caatdggacg 20

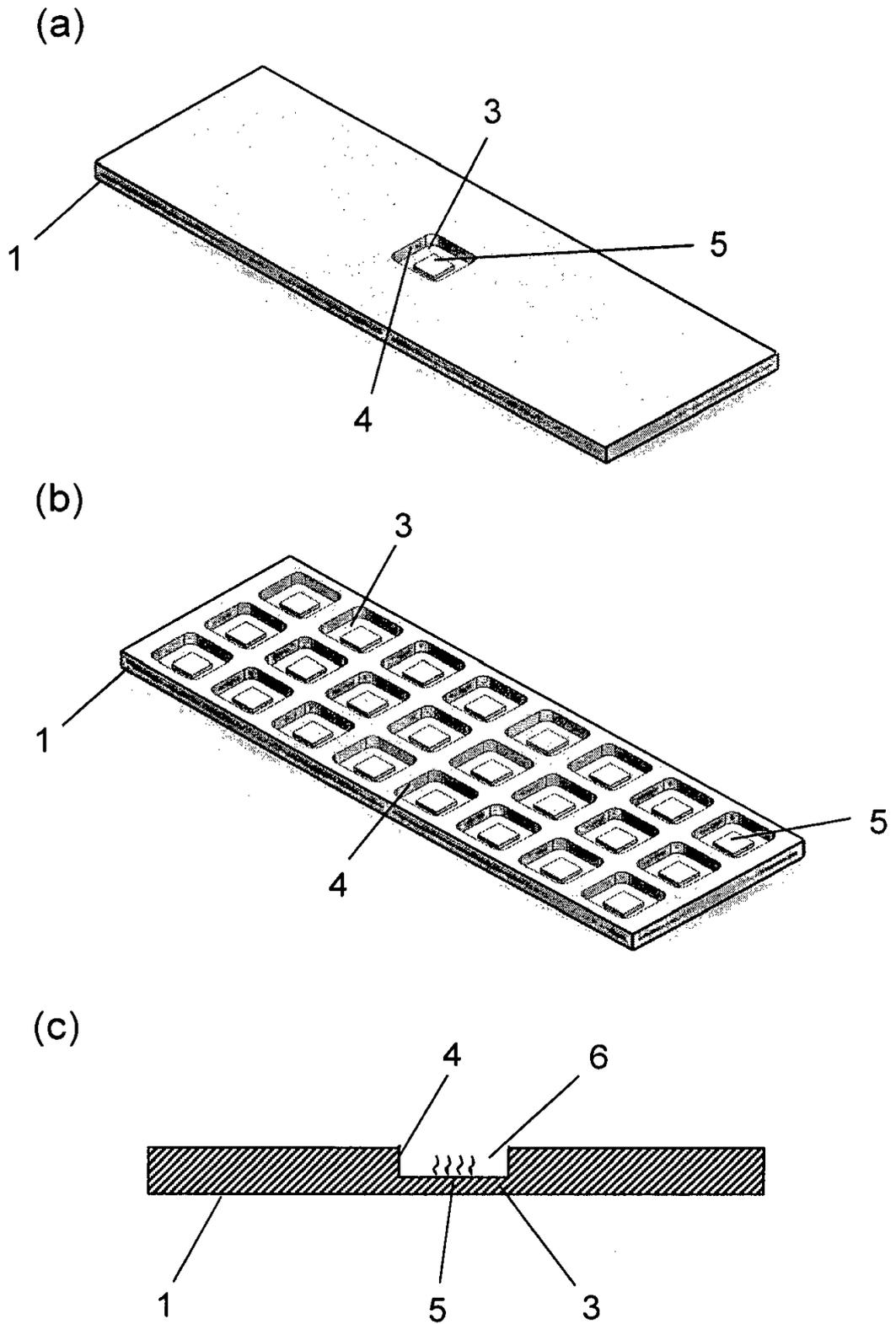
REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para remover una solución que contiene una sustancia a ensayar, inyectada en un chip de análisis, en el que:
- 5 dicho chip de análisis comprende un hueco en el que se inyecta dicha solución que contiene una sustancia a ensayar; y
- 10 una sustancia de unión selectiva, que se une selectivamente a dicha sustancia a ensayar, se inmoviliza en la totalidad o en una parte de la superficie inferior de dicho hueco, comprendiendo dicho procedimiento:
- inyectar dicha solución que contiene la sustancia a ensayar en el espacio de dicho hueco de dicho chip de análisis, de tal modo que dicho espacio queda parcialmente sin llenar; y
- 15 hacer girar dicho chip de análisis al que se ha inyectado dicha solución que contiene la sustancia a ensayar, aplicando una aceleración centrífuga no menor de $1 \times g$,
- en el que dicho chip de análisis al que se ha inyectado dicha solución que contiene la sustancia a ensayar se hace girar con un radio de rotación de 0,1 mm a 10 mm, y
- 20 en el que dicha solución que contiene la sustancia a ensayar es inyectada en dicho hueco, de tal modo que queda sin llenar del 10 % al 70 % de dicho espacio.
2. Procedimiento para remover una solución, según la reivindicación 1, en el que dicho chip de análisis comprende varios huecos en los que se inyecta dicha solución que contiene la sustancia a ensayar, estando dicha serie de huecos separados entre sí mediante una o varias paredes.
- 25
3. Procedimiento para remover una solución, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que dicho chip de análisis está dotado de una tapa que cubre la totalidad de dicho hueco o huecos; y dicha solución que contiene la sustancia a ensayar se cierra de manera estanca en dicho hueco o huecos.
- 30
4. Procedimiento para remover una solución, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho chip de análisis en el que se inyecta dicha solución que contiene la sustancia a ensayar está dispuesto de tal modo que la superficie o superficies inferiores de dicho hueco o huecos es/son horizontales o sustancialmente horizontales; y se hace girar dicho chip de análisis en dirección horizontal o sustancialmente horizontal.
- 35
5. Procedimiento para analizar una sustancia a ensayar, comprendiendo dicho procedimiento:
- 40 permitir que dicha sustancia a ensayar se una a una sustancia de unión selectiva inmovilizada en un chip de análisis, en el que dicho chip de análisis comprende un hueco en el que se inyecta dicha solución que contiene la sustancia a ensayar; y
- 45 dicha sustancia de unión selectiva, que se une selectivamente a dicha sustancia a ensayar, es inmovilizada en la totalidad o en una parte de la superficie inferior de dicho hueco, inyectando dicha solución que contiene la sustancia a ensayar al espacio en dicho hueco de dicho chip de análisis, de tal modo que dicho espacio queda parcialmente sin llenar; y
- 50 hacer girar dicho chip de análisis al que se ha inyectado dicha solución que contiene la sustancia a ensayar, aplicando una aceleración centrífuga no menor de $1 \times g$,
- en el que dicho chip de análisis al que se ha inyectado dicha solución que contiene la sustancia a ensayar se hace girar con un radio de rotación de 0,1 mm a 10 mm, y
- 55 en el que dicha solución que contiene la sustancia a ensayar es inyectada en dicho hueco, de tal modo que queda sin llenar del 10 % al 70 % de dicho espacio; y
- detectar dicha sustancia a ensayar unida a dicha sustancia de unión selectiva.

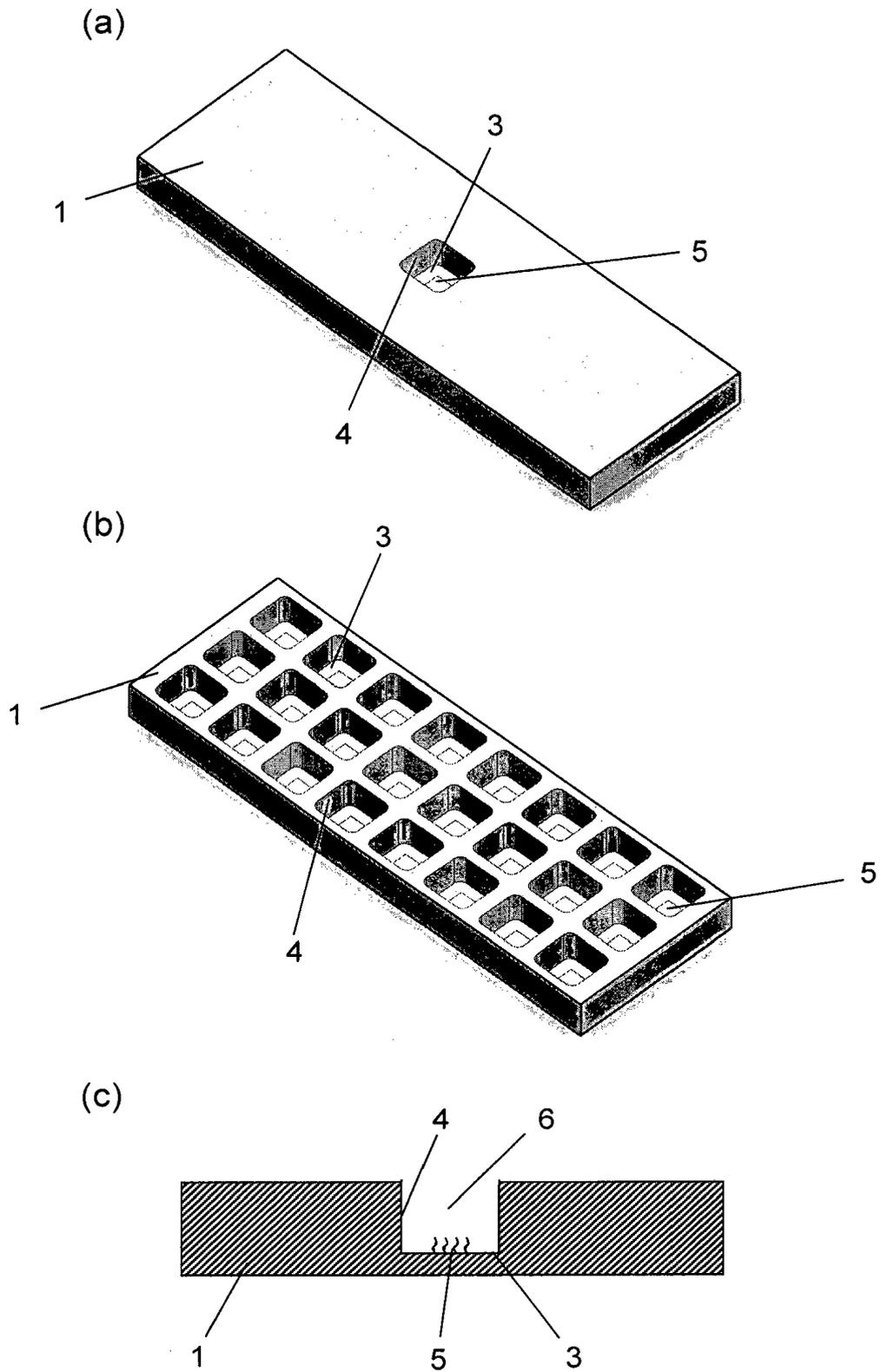
[Figura 1]



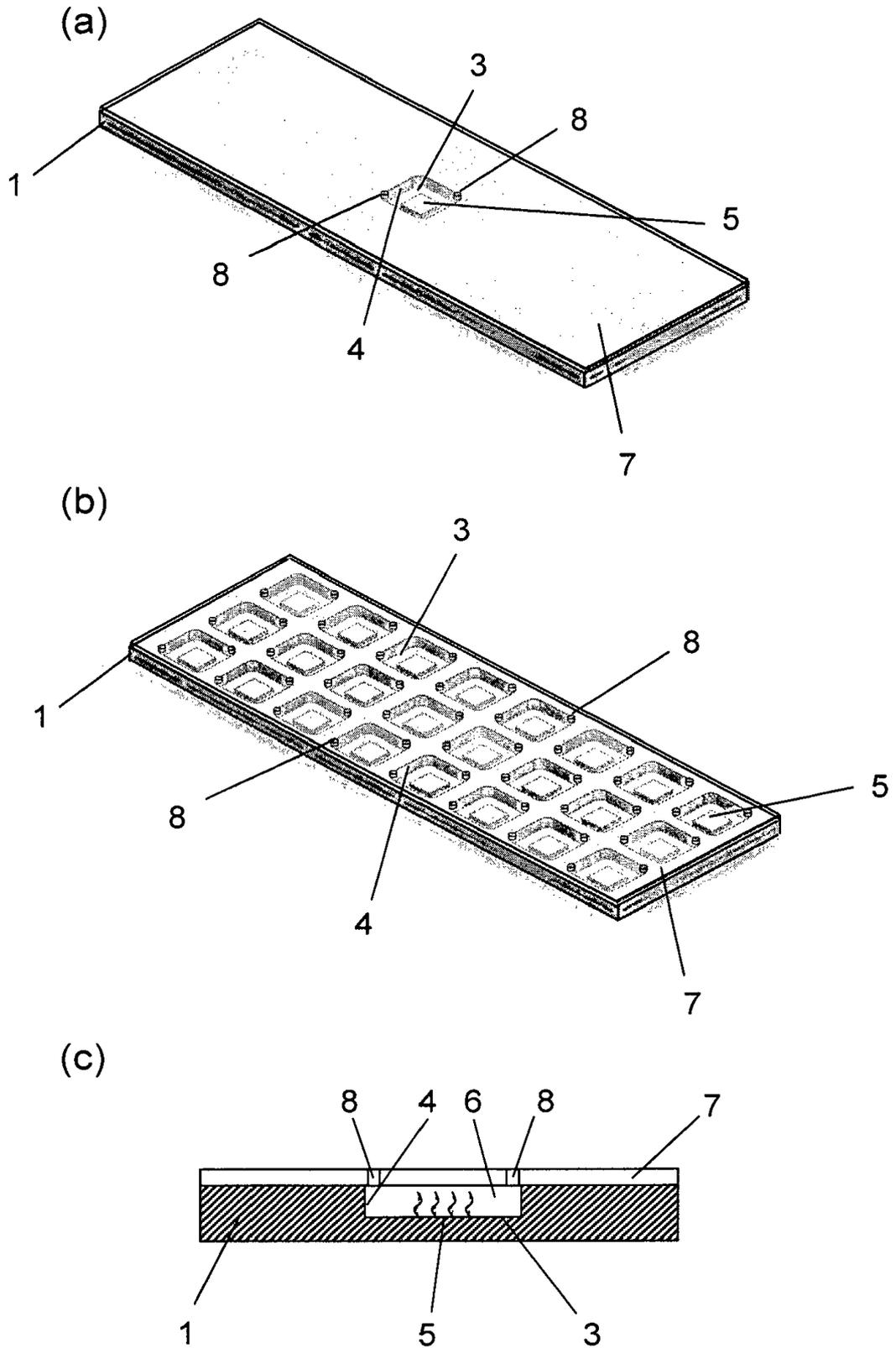
[Figura 2]



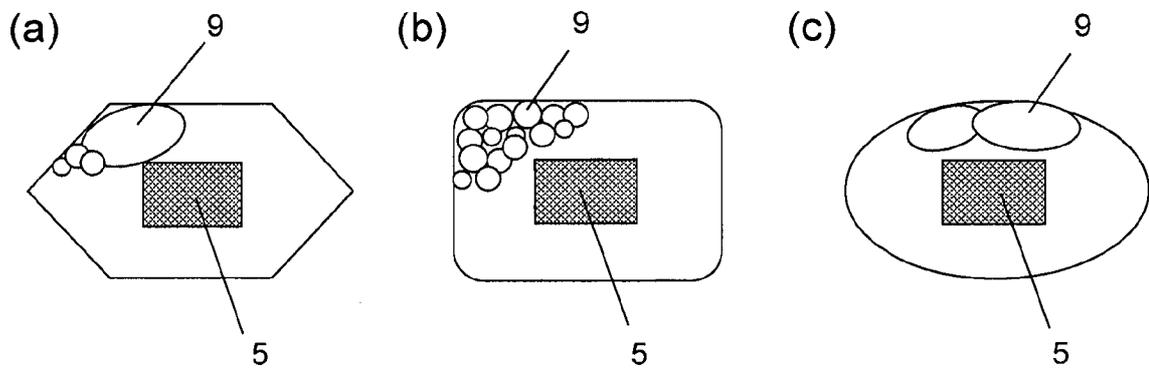
[Figura 3]



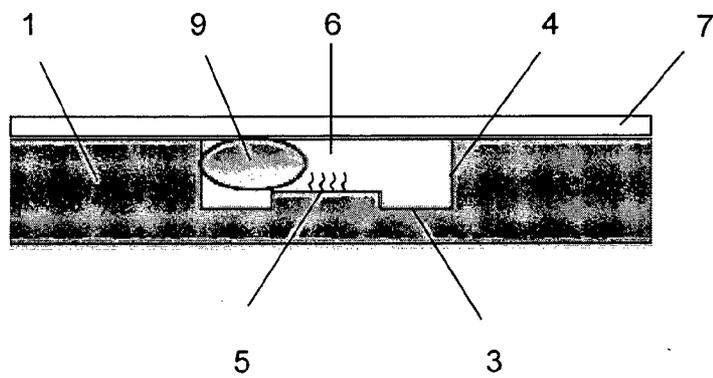
[Figura 4]



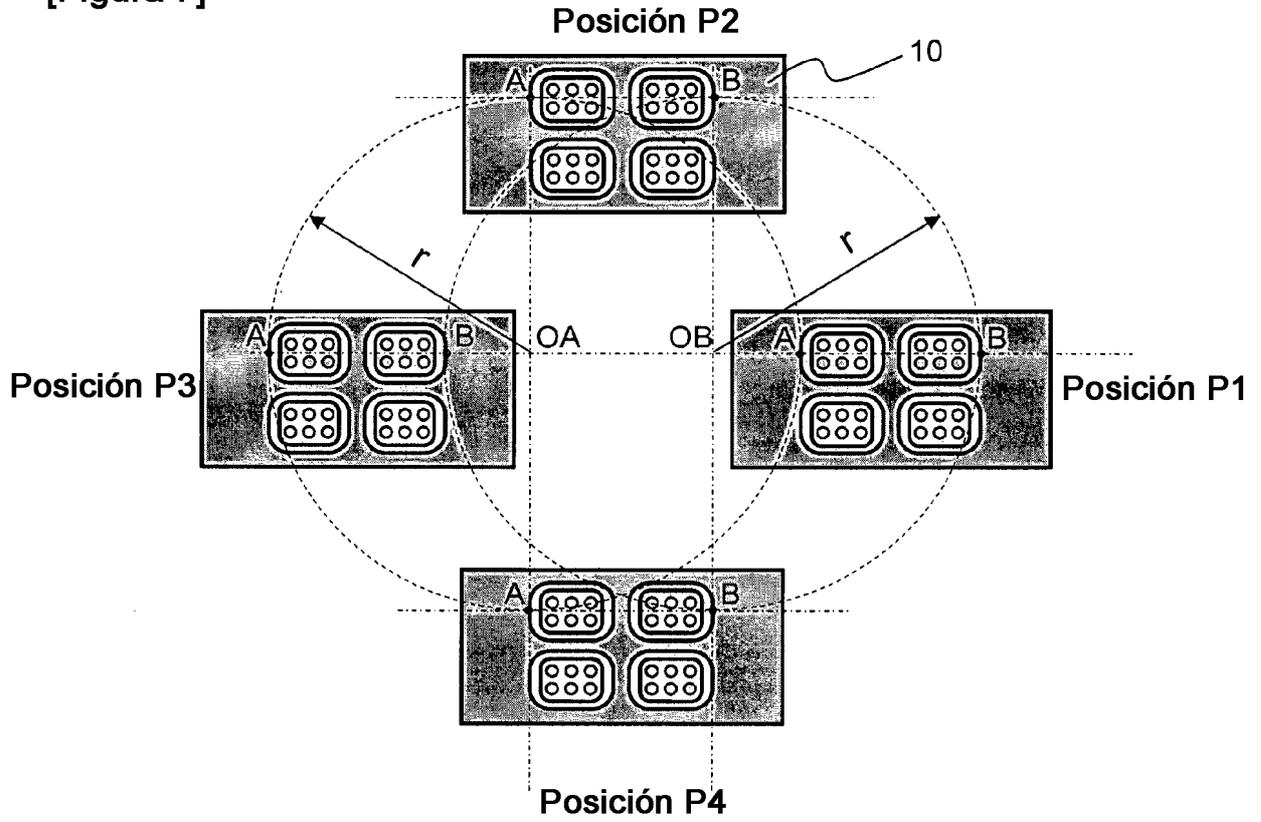
[Figura 5]



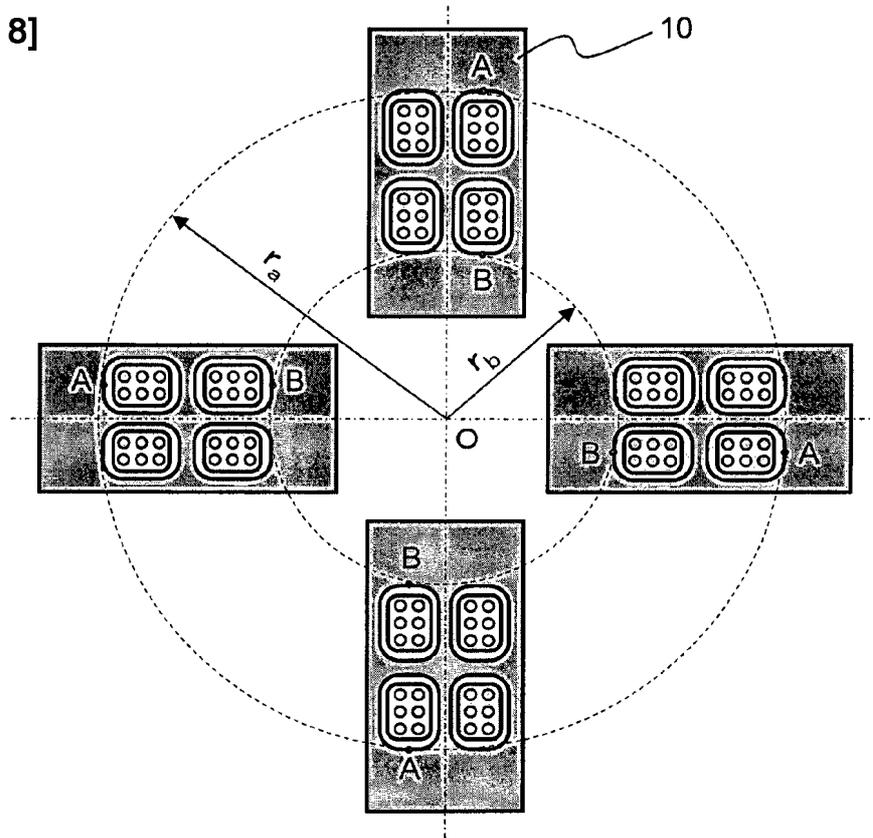
[Figura 6]



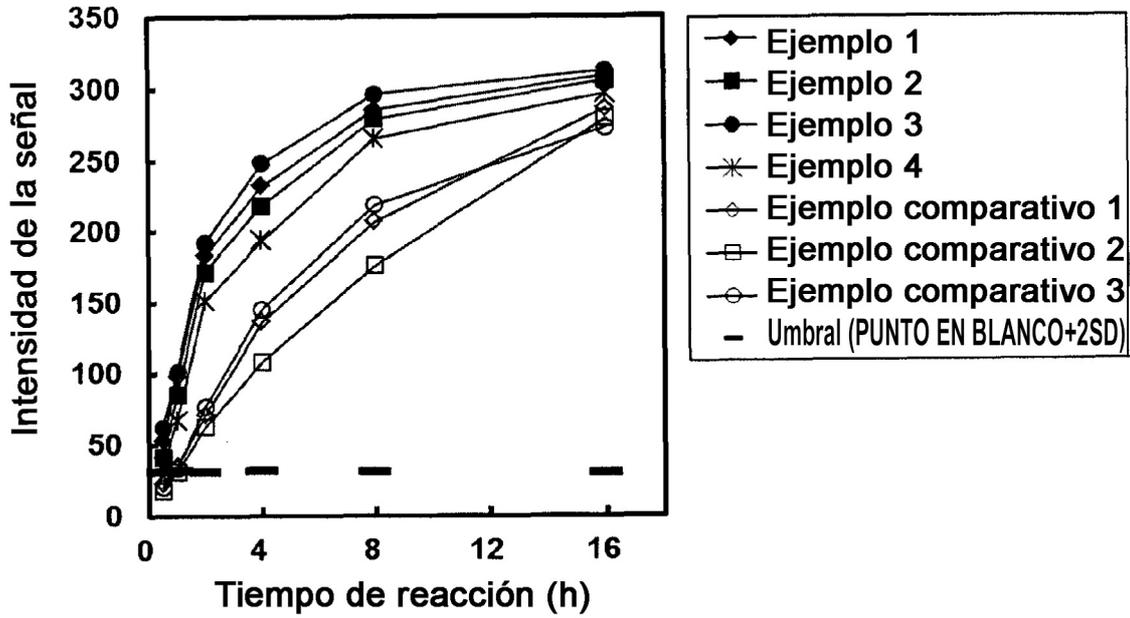
[Figura 7]



[Figura 8]



[Figura 9]



[Figura 10]

