

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 623 605**

51 Int. Cl.:

**C12P 19/34** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2006.01)

**C12Q 1/25** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.10.2009 PCT/RU2009/000531**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.04.2010 WO10047619**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.10.2009 E 09822256 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.02.2017 EP 2348123**

54 Título: **Método para determinar ácidos nucleicos por reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real y un dispositivo para su implementación**

30 Prioridad:

**23.10.2008 RU 2008143309**

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

**11.07.2017**

73 Titular/es:

**STROGANOV, ALEXANDER ANATOLIEVICH (50.0%)**

**Ul. Stasovoy, 2-479**

**St. Petersburg 195252, RU y**

**SLYADNEV, MAKSIM NIKOLAEVICH (50.0%)**

72 Inventor/es:

**STROGANOV, ALEXANDER ANATOLIEVICH y**

**SLYADNEV, MAKSIM NIKOLAEVICH**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

ES 2 623 605 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**

Método para determinar ácidos nucleicos por reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real y un dispositivo para su implementación

5

**Campo de la invención**

La invención se refiere a biología molecular, medicina y biotecnología y está relacionada con la realización de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y un dispositivo para su implementación con registro en tiempo real de la acumulación de productos de reacción (PCR en tiempo real, rt-PCR). El método y el dispositivo propuestos pueden usarse en medicina, veterinaria, procesado de alimentos, investigaciones medioambientales y en otros campos relacionados con la detección, la identificación y la evaluación cuantitativa de ácidos nucleicos en las muestras objeto de investigación.

10

La PCR representa múltiples ciclos repetidos de síntesis de un fragmento específico de ADN (amplificación) producido por cambios cíclicos de la temperatura de la mezcla de reacción y que dan lugar a un aumento exponencial de las cantidades del fragmento de ADN limitado por dos oligonucleótidos iniciadores. El cambio cíclico de la temperatura de la mezcla de reacción que los especialistas en el campo conocen como ciclo térmico pasa por las etapas consecutivas siguientes: desnaturalización de la molécula de ADN deseada de doble cadena (fusión), unión de oligonucleótidos iniciadores a lugares complementarios de las moléculas de ADN deseada de cadena simple formadas (recocido) y elongación de los iniciadores con la participación de la polimerasa termoestable hasta que se forman fragmentos alargados de moléculas de ADN complementarias (elongación). Las condiciones de realización de las etapas son conocidas por los especialistas en este campo.

15

20

La PCR se usa para amplificación de ácidos nucleicos y permite la detección y la identificación de la presencia y cantidad de ácido nucleico con la secuencia de nucleótidos deseada en la muestra de ADN/ARN.

25

El experimento PCR implica la preparación de una mezcla de reacción en una solución tampón que contiene en general polimerasa termoestable, desoxinucleótido trifosfatos, oligonucleótidos iniciadores, y iones magnesio. La muestra de ADN bajo investigación se añade a la mezcla para amplificación adicional con posterior registro de las secuencias de nucleótidos amplificadas (amplicones).

30

Para registro en tiempo real de los resultados de reacción, la reacción se realiza usando un termociclador equipado con un detector fluorescente en presencia de colorantes de intercalación fluorescentes o iniciadores o sondas etiquetados con fluorescencia.

35

**Términos y definiciones:**

La masa térmica del objeto (J/K) igual a la capacidad térmica del material del que se hace y multiplicada por su masa caracteriza la capacidad del objeto bajo investigación de cambiar su temperatura al suministro o a la extracción de energía calorífica. La masa térmica plena de un objeto compuesto conteniendo varias partes hechas de materiales diferentes es igual a la suma de las masas térmicas de todas sus partes.

40

El coeficiente de conductividad térmica del material (W/m<sup>2</sup>\*K) caracteriza la capacidad del material de conducir energía calorífica.

45

La conductancia térmica del objeto (W/K) igual al producto del coeficiente de conductividad térmica del material del que se hace y el área de la superficie de intercambio térmico dividida por el grosor del material caracteriza la capacidad del objeto de conducir energía calorífica a través de la superficie de intercambio térmico.

50

El coeficiente de difusividad térmica (m<sup>2</sup>/s) igual a la relación de la conductividad térmica del material al producto de su capacidad térmica por su densidad caracteriza la capacidad del material para intercambio térmico con el medio circundante con relación al proceso de acumulación de calor en el material propiamente dicho.

55

Las características siguientes son verdaderas para un sistema conteniendo dos objetos: el primer objeto que se calienta o enfría y el segundo objeto a través del que se intercambia el calor. La relación de la masa térmica del primer objeto a la conductancia térmica del segundo objeto expresada en segundos caracteriza la capacidad del sistema para el suministro rápido de calor al primer objeto a través del segundo y la extracción de calor del primer objeto a través del segundo.

60

**Estado de la técnica**

Los métodos PCR existentes que usan equipo comercialmente disponible se basan en general en la utilización de tubos de polímero que se instalan en bloques metálicos de calentamiento. La alta masa térmica de los bloques de calentamiento estándar con tubos instalados en ellos y las muestras, la baja conductividad térmica de las paredes de los tubos restringen las tasas de calentamiento y enfriamiento de la muestra y puede dar lugar a no uniformidad a

65

temperatura a través de la muestra en el tubo.

Al usar dispositivos de laboratorio ordinarios previstos para PCR en tubos de polímero o placas, el tiempo recomendado de mantenimiento de la temperatura durante el ciclo térmico es 2 minutos o más. Ausubel y colaboradores, eds. (1996) *Current Protocols in Molecular Biology*, Current Protocols, Greene Publishing Associates, Inc. Y John Wiley & Sons, Inc., por ejemplo, recomiendan usar una duración de cinco minutos por ciclo excluyendo el tiempo para transiciones de temperatura. Como resultado, el análisis PCR que consta de 40 ciclos térmicos tardaría 3 horas o más en completarse usando equipo PCR típico con un volumen de muestra de 20-50 µl.

Con el fin de disminuir el tiempo empleado en un ciclo, se han propuesto recientemente muchos métodos de análisis PCR en recipientes de reacción en miniatura. Para aumentar el tiempo requerido para la transición de temperatura, la masa del elemento de calentamiento, la masa de los recipientes y el volumen de las muestras en tales dispositivos se han reducido considerablemente, lo que ha permitido la reducción de la masa térmica, el uso de materiales con altos coeficientes de conductividad térmica y una relación más alta del área superficial de la muestra a su volumen. También se usan métodos de suministrar calor sin contacto a la muestra para calentamiento. Por ejemplo, RapidCycler (Idaho Technologies Inc., Estados Unidos de América) permite un cambio relativamente rápido de la temperatura de la mezcla PCR durante la transición de temperatura y asegura una transferencia de calor relativamente efectiva del calentador a las muestras. En este dispositivo, se puede completar 30 ciclos de rt-PCR en 10 minutos.

También hay métodos implementados en dispositivos microfluídicos que permiten reducir el tiempo requerido para un ciclo. Kopp y colaboradores (1998) *Science*, 280:1046, por ejemplo, describe un dispositivo donde la mezcla PCR fluye sucesivamente a través de un microcanal en forma de un meandro en el chip microfluídico a través de tres zonas de temperatura, lo que da lugar a un cambio cíclico de la temperatura PCR durante 20 ciclos térmicos. Dado que la sección transversal del microcanal es relativamente pequeña, la temperatura de la solución dentro del microcanal se establece de forma bastante rápida. El tiempo durante el que la mezcla está a una cierta temperatura se regula en este caso por la tasa de flujo. Los autores demostraron la posibilidad de PCR en el dispositivo descrito con un tiempo de ciclo de 6,6 segundos.

Así, la aplicación de tecnologías de microchip permite una disminución significativa del tiempo de ciclo PCR, lo que da lugar a una disminución del tiempo total de análisis PCR y a una mayor producción.

Sin embargo, la implementación de rt-PCR en tales dispositivos microfluídicos se enfrenta a algunas dificultades.

La relación más alta del área superficial entre el microrreactor y la muestra al volumen da lugar a una disminución de la actividad de polimerasa e incluso a la inactivación irreversible de la enzima. Las superficies de materiales como silicio, metales, cuarzo y vidrio muestran una sorción irreversible de ADN y enzima, así como otros componentes de la reacción. Para eliminar las restricciones hay que añadir sustancias que eviten la sorción y la desactivación de componentes PCR, tal como aminoácidos, péptidos y surfactantes, a la mezcla de reacción [Patente de Estados Unidos 6.660.517 "Mesoscale polynucleotide amplification devices"]. La misma patente también presenta algunos métodos que permiten la pasivación de la superficie del microrreactor PCR. Tales capas de protección evitan la adsorción y la inhibición de componentes PCR, lo que permite lograr alta sensibilidad del análisis PCR.

Uno de los problemas conocidos por los especialistas en análisis PCR es la evaporación de la muestra durante la fase de ciclo térmico. Dado que la temperatura de desnaturalización de ADN está próxima al punto de ebullición del agua, la intensiva evaporación de la mezcla PCR durante la reacción puede inhibir el flujo PCR, que se elimina en general en los dispositivos estándar aislando la superficie de agua de mezcla de la atmósfera por medio de un líquido inmiscible con agua, por aceite mineral, por ejemplo, o usando una tapa calentada para sellar los recipientes de reacción.

En los canales cerrados de los chips microfluídicos, los microrreactores pueden estar sellados con válvulas en el microcanal [Patente de Estados Unidos 7.118.910 "Microfluidic device and methods of using the same"]. La implementación de este método de sellado es técnicamente complicada y aumenta el costo del análisis usando tal microchip.

La prevención de la evaporación durante el ciclo térmico con microchips conteniendo microrreactores de cavidad abierta se logra en general mediante el aislamiento de la mezcla de reacción de la atmósfera por aplicación de un líquido inmiscible con agua sobre la superficie de la solución acuosa de la mezcla de reacción, aceite mineral o de silicona, por ejemplo [Patente de Estados Unidos 6.664.044 "Method for conducting PCR protected from evaporation"]. Sin embargo, en el dispositivo descrito, se usa repetidas veces un sistema de inyección para inyectar PCR de trabajo y muestras, lo que puede dar lugar a degradación no controlada de los reactivos PCR y a la contaminación interna de las muestras en el proceso de aplicación. Otro método y dispositivo [Solicitud de Patente de Estados Unidos 20070196237 "Apparatus for regulating the temperature of a biological and/or chemical sample and method of using the same"] usa un microchip con volúmenes de reacción sobre la superficie de sustrato que son una gotita de un líquido inmiscible con agua, con la mezcla PCR colocada en él. Sin embargo, en este método, la mezcla de reacción está separada de la superficie calentada de sustrato por una capa del líquido inmiscible con

agua, lo que ralentiza el proceso de calentamiento y enfriamiento. Además, los volúmenes de reacción en este método pueden moverse de forma no controlable, dado que toda la superficie del sustrato termoconductor es hidrófoba. Puede dar lugar a discordancia espacial de la zona calentada y la muestra calentada en el proceso de la introducción y el ciclo térmico de la muestra, lo que dará lugar a resultados poco fiables del análisis PCR.

Otro inconveniente común de los dispositivos microfluídicos conocidos es la mayor intensidad de personal al mezclar las muestras con los componentes de mezcla PCR antes de la introducción al microchip. Además, este procedimiento requiere costos para consumibles adicionales (puntas de plástico, tubos) y es prácticamente irrealizable en los tubos usuales, siendo el volumen de los líquidos manejados de menos de un microlitro debido a la mayor probabilidad de evaporación de los reactivos y las muestras durante la mezcla. Hay métodos que permiten la inmovilización de uno o varios componentes de la mezcla de reacción necesarios para que la PCR en el microrreactor llene el microrreactor con una solución acuosa conteniendo ácidos nucleicos y los componentes restantes de la mezcla PCR [Patente de Estados Unidos 7.118.910 "Microfluidic device and methods of using the same"]. Sin embargo, este método requiere mucho personal y es difícil de controlar durante la producción puesto que requiere la aplicación de reactivos biológicos directamente en el proceso de fabricación del microchip, lo que incrementa el peligro del impacto negativo de posteriores procesos tecnológicos en los reactivos aplicados (impacto de mayor temperatura, compuestos químicos, emisión).

Hay métodos que implican la liofilización de la mezcla PCR preparada conteniendo todos o casi todos los reactivos PCR y estabilizadores adicionales en los tubos [Patente RF 2259401 "Dry mixture of reagents for polymerase chain reaction and method of PCR analysis", Patente de Estados Unidos 6.153.412 "Lyophilized reagent for polymerase chain reaction"]. Este método puede implementarse prácticamente en cualquier sistema de microrreactor con reactores abiertos.

El documento de Zhang C y colaboradores., "Miniaturized PCR chips for nucleic acid amplification and analysis: latest advances and future trends", Nucleic Acid Research, vol. 35, Nº 13, Enero, 2007, páginas 4223-4237, resume la investigación sobre sustratos de chip, tratamientos superficiales, volumen y velocidad de reacción PCR, arquitectura, métodos para eliminar la contaminación cruzada y el control y la medición de temperatura y el flujo de líquido. También se discuten métodos de detección de producto, integración de componentes funcionales, muestras biológicas usadas en chips PCR, aplicaciones potenciales y otras cuestiones prácticas relacionadas con la implementación de tecnologías de laboratorio en chip.

A pesar del gran número de métodos y dispositivos disponibles de implementación de rt-PCR en formatos microfluídicos y de microchip, todavía es grande la necesidad de desarrollar métodos y dispositivos nuevos y mejorados. Este campo técnico necesita un método de costo razonable de expresar la identificación cuantitativa de ácidos nucleicos de una variedad de muestras con alta sensibilidad sin grandes costos de personal en la preparación del análisis y también necesita un dispositivo para su implementación.

Puede afirmarse que el análogo más próximo a la presente invención es el método y el dispositivo descrito en la Solicitud de Patente de Estados Unidos 20070196237 "Apparatus for regulating the temperature of a biological and/or chemical sample and method of using the same". La solicitud describe el método de realizar reacciones bioquímicas, incluyendo rt-PCR, conteniendo etapas de ciclo térmico y detección fluorescente de señales usando un módulo de termorregulación incluyendo un calentador y detector de temperatura. Un sustrato de un material termoconductor está colocado en el módulo y se aplica una muestra biológica sobre el sustrato, por ejemplo, una mezcla conteniendo todos los componentes para análisis PCR en tiempo real que se aísla de la atmósfera introduciéndola en una célula de reacción virtual formada por un líquido inmiscible con agua, por aceite mineral, por ejemplo.

Los principales inconvenientes del prototipo son las bajas tasas reales de calentamiento y enfriamiento de la muestra; la complejidad tecnológica del módulo de termorregulación con microcalentadores y termosensores integrados, que da lugar a costos más altos y reduce el atractivo comercial del dispositivo. Otro inconveniente del prototipo análogo es la reducción de sensibilidad no controlada en el posible contacto de la muestra con la superficie del material termoconductor. Además, el método y el dispositivo descritos en la descripción del prototipo análogo requieren la preparación preliminar de las soluciones de componentes PCR, la mezcla de componentes PCR con la muestra y la introducción de la mezcla resultante en zonas de reacción, lo que da lugar a costos de personal adicionales, un riesgo más alto de errores del operador y costos de análisis más altos debidos a la creciente cantidad de consumibles (tubos, puntas para la unidad de dosificación, reactivos). Otro inconveniente del prototipo análogo es la posibilidad de discordancia espacial de la zona calentada y la muestra calentada en el proceso de la introducción de la muestra y el ciclo térmico, que dará lugar a resultados poco fiables del análisis PCR.

### Esencia de la invención

El objetivo de la presente invención es el desarrollo del método y dispositivo para su implementación que permitirán:

1. Reducir el tiempo del análisis y aumentar la producción del análisis;

2. Aumentar la sensibilidad, la exactitud y la fiabilidad del análisis;
3. Reducir los costos de personal de la identificación de ácidos nucleicos por el método rt-PCR;
- 5 4. Reducir el costo del análisis PCR.

Este objetivo se logra usando el método de identificación de ácidos nucleicos por medio de una reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real y un dispositivo para análisis rt-PCR conteniendo un microchip, como se describe en las reivindicaciones anexas.

10 El método propuesto implica la identificación de ácidos nucleicos por medio de una reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real incluyendo las etapas siguientes:

15 introducción de muestras líquidas conteniendo ácido nucleico a las zonas de reacción sobre la superficie superior del sustrato termoconductor y el aislamiento de las muestras introducidas con respecto a la atmósfera;

interacción del ácido nucleico de la muestra con los componentes de la reacción en cadena de la polimerasa durante el ciclo térmico de las muestras con extracción de calor a través de la superficie externa del microchip;

20 identificación fluorescente del cambio de la cantidad de los productos de reacción en cadena de la polimerasa en el proceso de ciclo térmico;

identificación de la cantidad del ácido nucleico inicial en las muestras por la dinámica de crecimiento de la señal fluorescente.

25 El microchip se fabrica con un sustrato termoconductor hecho de un material termoconductor con el coeficiente de conductividad térmica superior a  $1 \text{ W/cm}\cdot\text{K}$  y con un coeficiente de difusividad térmica superior a  $0,6 \text{ cm}^2/\text{s}$ . Las zonas de reacción sobre la superficie del microchip están separadas del sustrato termoconductor por una capa de un material pasivante unido de forma covalente a la superficie del material termoconductor. Las muestras introducidas están aisladas de la atmósfera por una capa de líquido que se retiene en la superficie superior del sustrato termoconductor por medio de un bastidor; la relación de la masa térmica agregada del microchip con las muestras introducidas y la capa de un líquido inmiscible con agua a la conductancia térmica del sustrato de microchip no excede de  $0,04 \text{ s}$ .

35 El dispositivo para implementación de este método contiene un microchip con al menos una zona de reacción en su superficie que está unida de forma mecánica con el soporte de microchip, unida térmicamente con el bloque de ciclo térmico y unida de forma óptica con el detector fluorescente de emisión; el dispositivo también contiene al menos una fuente de emisión de luz unida de forma óptica con el bloque de filtración de la emisión del canal de iluminación y con el microchip; este detector de emisión fluorescente está unido de forma óptica con el microchip mediante el bloque de filtración del canal de emisión mientras que este bloque de ciclo térmico se realiza con la posibilidad de calentar, enfriar y mantener la temperatura del microchip; además, el dispositivo contiene un sistema de control unido eléctricamente con el detector identificado, la fuente de emisión y el bloque de ciclo térmico.

45 En tal caso, el microchip contiene un sustrato termoconductor fabricado de un material con un coeficiente de conductividad térmica superior a  $1 \text{ W/cm}\cdot\text{K}$  y un coeficiente de difusividad térmica superior a  $0,6 \text{ cm}^2/\text{s}$ ; cada zona de reacción en la superficie del microchip está separada del sustrato termoconductor por una capa de un material pasivante unida de forma covalente con la superficie del sustrato termoconductor; en la superficie superior de este microchip hay un bastidor con la posibilidad de retener la cantidad asignada del líquido inmiscible con agua en la superficie superior del microchip; la relación de la masa térmica agregada del microchip con las muestras introducidas y la capa del líquido inmiscible con agua a la conductancia térmica del sustrato de microchip no excede de  $0,04 \text{ s}$ .

Las características agregadas de la invención propuesta debidas a:

- 55 1) una tasa incrementada de ciclo térmico;
- 2) eliminación de inhibición de la reacción por medio de una capa de protección de la superficie de las zonas de reacción;
- 60 3) eliminación de desplazamiento no controlado de la muestra con relación a la zona de reacción;
- 4) creación de un microchip conteniendo reactivos PCR secados necesarios para la identificación de los ácidos nucleicos asignados;
- 65 5) reducido consumo de reactivos y consumibles y menor intensidad de personal del análisis,

5 permiten cumplir la tarea establecida. La invención propuesta usa un microchip, su sustrato fabricado a partir de materiales con conductividad térmica y difusión térmica; la superficie de las zonas de reacción en la superficie superior del microchip está cubierta con una capa pasivante, la evaporación de la mezcla PCR se evita por medio de una capa de líquido aislante y el microchip también puede contener uno o varios componentes de mezcla PCR en las zonas de reacción.

Hay varios posibles esquemas de implementación del método descrito en la presente invención.

10 Hay varias variantes de interacción del ácido nucleico de la muestra con componentes PCR. Por ejemplo, antes del análisis, la muestra conteniendo ácido nucleico se mezcla con uno o varios componentes de la mezcla PCR. También es posible mezclar la muestra con la solución conteniendo todos los componentes necesarios para realizar el análisis PCR. También es posible mezclar la muestra con la solución tampón conteniendo un componente, por ejemplo, iones magnesio  $Mg^{2+}$  o varios componentes, por ejemplo, iones magnesio  $Mg^{2+}$  y polimerasa, o iones magnesio  $Mg^{2+}$ , oligonucleótidos iniciadores, y sondas de fluorescencia. En tales casos, la adición de los componentes restantes para el análisis PCR puede realizarse por la introducción de soluciones conteniendo estos componentes antes o después de la introducción de las muestras por cualquier método conocido, se prefiere que los componentes PCR restantes sean introducidos a las zonas de reacción antes de la introducción de la muestra.

20 Es aún más ventajoso que los componentes PCR sean introducidos a las zonas de reacción en forma secada antes de la introducción de las muestras. Para lograrlo, puede colocarse uno o más componentes PCR en forma de una solución acuosa en las zonas de reacción en la superficie del microchip en la capa del material pasivante y la solución deberá secarse. Este método supone que los componentes PCR, tal como desoxinucleótido trifosfatos, oligonucleótidos iniciadores directos e inversos, sondas con etiquetas fluorescentes deberán introducirse en las zonas de reacción y secarse. Es aún más preferible introducir a las zonas de reacción y secar desoxinucleótido trifosfatos, oligonucleótidos iniciadores directos e inversos, sondas con etiquetas fluorescentes, polimerasa termoestable, y estabilizadores. Los estabilizadores para esta finalidad pueden elegirse a partir de polisacáridos, tal como manitol, glucosa o sacarosa.

30 El método sugiere que la identificación fluorescente del cambio de la cantidad de los productos de reacción en cadena de la polimerasa en las muestras bajo ciclo térmico puede realizarse exponiendo las muestras a emisión con un rango seleccionado de longitudes de onda y por el registro de la señal de fluorescencia en el rango seleccionado de longitudes de onda. La emisión de fluorescencia deberá realizarse preferiblemente en el rango de 350-700 nm, y el registro en el rango de 450-1000 nm.

35 Entonces, el método prevé que el microchip pueda fabricarse a partir de varios materiales, preferiblemente con altos coeficientes de conductividad térmica (superiores a 1 W/cm·K) y difusividad térmica (superior a 0,6 cm<sup>2</sup>/s). Tales materiales pueden incluir metales, tales como aluminio, cobre, o dieléctricos, tales como silicio o cerámica. El aluminio y el silicio pueden considerarse los más adecuados. Para asegurar una pequeña masa térmica del microchip, su tamaño y masa deberán ser pequeños. El grosor del sustrato deberá ser preferiblemente inferior a 1 mm para asegurar alta conductividad térmica.

45 El método prevé que la capa del material pasivante se haga de sustancias que eviten la adsorción irreversible de los componentes PCR y la inhibición de reacción. La capa deberá aplicarse preferiblemente sobre la superficie por unión covalente con el material del sustrato termoconductor del microchip para aumentar las propiedades resistivas de la capa pasivante en almacenamiento prolongado y al ciclo térmico durante la reacción. Las sustancias que pueden usarse para esta finalidad pueden ser óxido de aluminio, óxido de silicio, y moléculas orgánicas capaces de formar monocapas o películas poliméricas. Las moléculas orgánicas pueden ser poldimetilsiloxano, polimetilmetoxisiloxano, 3-glicidoxipropiltrimetoxisilano, y etilenglicol diglicidil éter.

50 Es aún más preferible que la capa pasivante en las zonas de reacción posea propiedades hidrófilas para garantizar buena difusibilidad de la solución durante la introducción de la mezcla PCR en la zona de reacción. Al mismo tiempo, es preferible que la capa del material pasivante fuera de las zonas de reacción sea hidrófoba para evitar el derrame de la solución acuosa más allá de los bordes de la zona de reacción.

55 La variante más preferible es cuando el material pasivante en las zonas de reacción se forme como resultado de la reacción de una capa de 3-glicidoxipropil-trimetoxisilano y etilenglicol diglicidil éter.

También es preferible que los materiales pasivantes fuera del área de las zonas de reacción se formen a partir de la capa de polímero de polimetilmetoxisiloxano.

60 El aislamiento de las muestras con respecto al aire en las zonas de reacción puede lograrse aplicando una capa de un líquido aislante en las zonas de reacción. El líquido aislante deberá ser preferiblemente líquidos inmiscibles con agua con una densidad menor que el agua, y con el punto de ebullición superior a 100°C a presión atmosférica. Los líquidos aislantes deberán ser aceites minerales, fluidos de silicio de varias viscosidades y sus mezclas. El método prevé que el líquido aislante sea transparente en los rangos espectrales de emisión y registro de la excitación de fluorescencia y el registro de colorantes fluorescentes usados para la detección de los productos rt-PCR. Es

preferible que la transmitancia óptica del líquido aislante en este rango espectral no sea inferior a 10%. Es aún más preferible que la capa aislante en el rango del registro de colorantes luminiscentes cree una señal fluorescente no superior a 10% de la señal creada por las muestras en las zonas de reacción.

5 El método prevé que la capa del líquido aislante pueda aplicarse tanto una vez (antes o después de la introducción de las muestras) como dos veces: primero se aplica la capa del líquido aislante sobre las zonas de reacción no llenadas, a continuación se introducen las muestras líquidas a través de dicha capa del líquido aislante y luego se añade el líquido aislante.

10 Son posibles varias soluciones de construcción y disposición del dispositivo de la presente invención.

El microchip de silicio de al menos una zona de reacción en su superficie puede fabricarse por fotolitografía con posterior ataque químico anisotrópico o isotrópico líquido que es conocido por los especialistas en el campo de los sistemas microelectromecánicos. El microchip de metal, cerámica o plástico puede fabricarse con tolerancia estrecha por forja, vaciado en caliente, extirpación por láser, ataque químico isotrópico líquido, ataque químico con plasma que son conocidos por los especialistas en este campo. Las dimensiones de la zona de reacción deberán elegirse a partir del rango de  $10^1$ - $10^4$   $\mu\text{m}$  en longitud y anchura y  $10^1$ - $10^3$   $\mu\text{m}$  en profundidad. Es preferible que las dimensiones de la zona de reacción sean  $5 \times 10^2$ - $5 \times 10^3$   $\mu\text{m}$  en longitud y anchura, y  $2 \times 10^2$ - $5 \times 10^2$   $\mu\text{m}$  en profundidad.

20 Las dimensiones del microchip deberán elegirse de modo que la masa térmica del microchip sea pequeña, y el grosor del sustrato conductor térmico deberá ser mínimo asegurando suficiente estabilidad de la construcción.

25 Es deseable que la relación de la masa térmica del microchip con las muestras introducidas y la capa del líquido inmisible con agua a la conductividad térmica del sustrato sea inferior a 0,04 s. Por ejemplo, estas condiciones las cumple un microchip con dimensiones de sustrato de longitud x anchura x altura (L x An x Al) de 28 x 25 x 0,6 mm, con 16 zonas de reacción con la longitud x anchura x profundidad (L x An x Al) de 2 x 2 x 0,4 mm cada una, con una barrera periférica de poliácridamida en forma de un bastidor rectangular de L x An x Al de 28 x 25 x 3 mm y la anchura de borde de 4 mm.

30 La barrera periférica se puede hacer de un elemento de construcción que pase por encima de la superficie superior del microchip y forme un bucle cerrado de modo que el líquido aislante se contenga en este bucle en el proceso de la PCR. La barrera periférica se puede hacer del material del sustrato termoconductor del microchip. Es preferible que el material para la barrera periférica tenga un coeficiente de conductividad térmica bajo y baja capacidad térmica. La barrera periférica puede ser una capa del material con propiedades oleofóbicas aplicadas en la superficie del microchip alrededor de las zonas de reacción. Los materiales preferidos con propiedades oleofóbicas son alquil silanos con cadenas de fluorohidrocarbonos saturadas. La barrera periférica puede fabricarse como una combinación del elemento constructivo y una capa de material oleofóbico. Es preferible que la capa periférica se fabrique con la posibilidad de aislar las zonas de reacción de la atmósfera aplicando una película adhesiva sobre ella.

35 La capa pasivante sobre la superficie del microchip unida de forma covalente a la superficie del microchip puede obtenerse por reacciones químicas en la superficie del microchip. Estas reacciones pueden realizarse por la interacción de los componentes procedentes de la fase gas con la superficie del microchip, por ejemplo en oxidación termoquímica de silicio con formación de una capa de dióxido de silicio. Es preferible que estas reacciones se realicen durante el contacto entre componentes de fase líquido y la superficie del microchip. El material pasivante deberá depositarse preferiblemente por separado en la superficie del microchip en las zonas de reacción y fuera de estas zonas. Es aún más preferible aplicar una capa de polimetilmetoxisiloxano con propiedades hidrófobas sobre la superficie del microchip fuera de las zonas de reacción por humectación por contacto de las zonas con la solución de polimetilmetoxisiloxano no polimerizado y posterior polimerización térmica. En este caso, la capa del material pasivante en las zonas de reacción puede aplicarse por sucesivas reacciones químicas en las zonas de reacción, por ejemplo, por sucesiva incubación de 3-glicidoxipropiltrimetoxisilano líquido y luego etilenglicol diglicidil éter líquido en las zonas de reacción.

40 Es preferible que la deposición de uno o varios componentes de la reacción en cadena de la polimerasa en las zonas de reacción sobre la superficie del microchip se realice secando las soluciones acuosas de dichos componentes de la mezcla PCR. Las soluciones conteniendo los componentes necesarios deberán introducirse a las zonas de reacción y secarse en una campana de seguridad laminar a temperatura ambiente. Es aún más ventajoso secar estas soluciones usando una técnica de liofilización, a baja temperatura (de  $-20^\circ\text{C}$  a  $-50^\circ\text{C}$ ) y presión (de 0,01 a 10 mm Hg).

45 El detector de fluorescencia puede incluir un bloque de filtración de emisión usando filtros de luz de absorción e interferencia así como espejos dicróicos. La fuente de emisión puede ser un diodo fotoemisor unido de forma óptica con el bloque de filtración de emisión y el microchip por medio de elementos ópticos, lentes y espejos, por ejemplo. Según la invención, para detectar varios componentes PCR en el mismo microrreactor en el dispositivo es posible utilizar un detector multicanal conteniendo varias fuentes de emisión y varios filtros de filtración de emisión con la

posibilidad de conmutación entre las fuentes y el bloque de filtración de emisión. Este detector multicanal se puede construir usando varios diodos fotoemisores, filtros y espejos dicróicos, con diferentes características espectrales. Es preferible que las fuentes de emisión y los bloques de filtración de emisión creen un flujo de luz en el rango espectral elegido de excitación de fluorescencia en el rango de 350-700 nm y permitan el registro de la señal fluorescente en el rango espectral seleccionado de 450-1000 nm. Los rangos espectrales de excitación de fluorescencia y registro deberán ser capaces de detectar colorantes fluorescentes comunes en la práctica de la detección PCR que son conocidos por los especialistas en este campo. Ejemplos de tales colorantes son: carboxifluoresceína (FAM), 6-carboxi-2',4',5',7'-hexafluoresceína (HEX), 6-carboxi-rodamina (R6G), carboxi-X-rodamina (ROX), tetrametilcarboxi-rodamina (TAMRA), 6-carboxi-4',5'-dicloro-2',7'-dimetoxifluoresceína (6-JOE), carboxi-rodamina (R110).

Un detector de fluorescencia puede ser un detector de matriz, un tubo fotomultiplicador o un fotodiodo. Según la invención, es preferible que el detector de radiación en el dispositivo sea un detector de matriz, por ejemplo, una matriz CCD (CCD es un dispositivo de acoplamiento de carga) o una matriz CMOS (CMOS es Metal-Óxido-Semiconductor complementario). En este caso, es preferible que la imagen del microchip se forme en el detector de matriz por medio de elementos ópticos, por ejemplo, por medio de una lente, espejo-lente u objetivo reflector. Es preferible que el detector de matriz permita el registro de la señal de fluorescencia en todo el rango espectral de 450-1000 nm.

El bloque de ciclo térmico unido térmicamente al microchip puede fabricarse con la posibilidad de calentar, enfriar y mantener la temperatura del microchip usando calefactores de resistencia, módulos termoeléctricos semiconductores (dispositivos Peltier), calefactores inductivos usando transferencia de energía en forma de emisión, calefactores usando transferencia de energía térmica por medio de un flujo de líquido o gas, incluyendo los que usan condensación y evaporación. Según la invención, es preferible que el bloque de ciclo térmico en el dispositivo se fabrique usando el dispositivo Peltier puesto que en este caso hay calentamiento activo y enfriamiento activo del microchip.

#### Lista de las figuras

La presente invención se ilustra con las figuras siguientes donde:

La figura 1 muestra el esquema del microchip para análisis PCR en tiempo real de ácidos nucleicos.

La figura 2 muestra una variante del esquema para implementación del método de análisis PCR en tiempo real de ácidos nucleicos con componentes secados de la reacción en cadena de la polimerasa.

La figura 3 muestra un ejemplo del esquema de diseño del analizador PCR de microchip.

La figura 4 muestra el resultado de identificación de ADN por análisis PCR en tiempo real usando el dispositivo según la invención usando las condiciones de temperatura recomendadas por el fabricante de los reactivos.

La figura 5 muestra el resultado de identificación de ADN por análisis PCR en tiempo real usando el dispositivo según la invención usando las condiciones de temperatura con duración acortada de las etapas PCR.

#### Descripción detallada de la invención

Un ejemplo de realización de microchip para implementación del método de análisis PCR en tiempo real de ácidos nucleicos según la presente invención se representa en las figuras 1 y 2. La muestra 2 está situada en la zona de reacción 1 sobre la superficie superior del microchip. El microchip contiene un sustrato termoconductor 3 hecho de un material termoconductor con el coeficiente de conductividad térmica superior a 1 W/cm·K y el coeficiente de difusión térmica superior a 0,6 cm<sup>2</sup>/s.

Según la variante de la realización representada en la figura 1, la zona de reacción 1 está separada del sustrato termoconductor 3 por una capa de un material pasivante 4 unido de forma covalente a la superficie del material termoconductor.

En otra realización representada en la figura 2, la zona de reacción 1 sobre la superficie del microchip está separada del sustrato termoconductor 3 por una capa de un material pasivante 7 con propiedades hidrófilas que está unido de forma covalente a la superficie del material termoconductor. Fuera de la zona de reacción 1, la superficie del sustrato termoconductor 3 está cubierta con una capa de un material pasivante 8 con propiedades hidrófobas que está unido de forma covalente a la superficie del material termoconductor. En la capa del material pasivante 8 en la zona de reacción 1 hay una capa 9 conteniendo uno o varios componentes secados de la reacción en cadena de la polimerasa.

Según las variantes de la realización representada en las figuras 1 y 2, la capa del líquido aislante 5 separa la muestra introducida 2 de la atmósfera. La barrera periférica 6 retiene la capa del líquido aislante 5 sobre la superficie



superior del sustrato termoconductor 3. Para implementar el método según la invención, la muestra 2 conteniendo ácido nucleico se introduce a la zona de reacción 1 a través de la capa del líquido aislante 5. El calentamiento y el enfriamiento de la muestra 2 colocada en la zona de reacción se llevan a cabo en el lado de la superficie inferior del sustrato termoconductor 3. La evaluación fluorescente de la cantidad de productos de reacción en cadena de la polimerasa en la muestra 2 colocada en la zona de reacción 1 en el proceso de ciclo térmico se realiza en el lado de la superficie superior del sustrato termoconductor 3 a través de la capa del líquido aislante 5.

Un ejemplo del diseño del dispositivo según la presente invención se representa en la figura 3. El dispositivo contiene al menos una zona de reacción sobre la superficie del microchip 10 que está unida de forma mecánica al soporte de microchip 11, unida térmicamente al bloque de ciclo térmico 12 y unida de forma óptica al detector de fluorescencia 13. El dispositivo contiene al menos una fuente de emisión 14 unida de forma óptica al bloque de filtración de la emisión del canal de iluminación 15, el espejo dicróico 16, la lente 17 y el microchip 10. El detector de fluorescencia 13 está unido de forma óptica al microchip 10 mediante la lente 17, el espejo dicróico 16 y el bloque de filtración de emisión del canal de registro 18. El bloque de ciclo térmico 12 se fabrica con la posibilidad de calentar, enfriar y mantener la temperatura del microchip 10. El dispositivo también contiene el sistema de control 19 unido eléctricamente al detector de emisión 13, al menos con una fuente de emisión 14 y el bloque de ciclo térmico 12. El sistema de control 19 se realiza con la posibilidad de conmutación entre fuentes de emisión 14 (si hay más de una fuente) así como con la posibilidad de cambiar el rango espectral del bloque (o bloques) de filtración de emisión.

El dispositivo opera de la forma siguiente. Se inserta el microchip 10 en el soporte de microchip 11. La superficie superior del microchip 10 se cubre con una capa del líquido aislante 5 y se introduce la muestra 2 a través de la zona de reacción 1. El soporte de microchip 11 con el microchip equipado 10 se instala después en el bloque de ciclo térmico 12. La radiación procedente de la fuente de radiación 14 es dirigida al bloque de filtración de la radiación del canal de iluminación 15, luego es reflejada por el espejo dicróico 16, llega a la lente 17 y a continuación a la muestra 2 situada en la zona de reacción del microchip 1 a través de la capa del líquido aislante 5. La radiación fluorescente de la muestra a través de la capa del líquido aislante 5 es recogida por la lente 17 y dirigida a través del espejo dicróico 16 y el bloque de filtración de la radiación del canal de registro 18 al detector de fluorescencia 13. El bloque de ciclo térmico 12 unido térmicamente al microchip 10 suministra y quita calor para calentar, enfriar y mantener la temperatura del microchip 10. Las altas tasas de calentamiento y enfriamiento se logran debido a la pequeña masa térmica agregada del microchip con muestras introducidas y la capa del líquido inmisible con agua (en el rango de 0,5 a 4 J/K) realizado con la posibilidad de usar el sustrato termoconductor con alta conductancia térmica (en el rango de 100-500 W/K), que da lugar a una pequeña relación de la masa térmica agregada del microchip a conductancia térmica del sustrato del microchip (en el rango de 0,001-0,04 s). Las condiciones de temperatura del bloque de ciclo térmico 12, la selección y activación de la fuente de radiación 14 así como la recogida y el procesado de las señales del detector de fluorescencia 13 durante el ciclo térmico de la muestra son controlados por un sistema de control 19 unido eléctricamente a los bloques 12, 13 y 14.

Información que confirma la posibilidad de implementación de la invención. La invención se ilustra con los ejemplos siguientes.

La descripción de estos ejemplos no deberá ser usada para restringir las reivindicaciones de esta patente; ilustra simplemente la posibilidad de que los especialistas en este campo implementen la invención.

#### **Ejemplo 1**

El microchip conteniendo 16 zonas de reacción en su superficie se fabricó a partir de pastillas de silicio pulidas de 0,6 mm de grosor usando el método de fotolitografía con posterior ataque químico anisotrópico en húmedo. Las dimensiones del sustrato termoconductor eran 25 x 28 x 0,6 mm. Las zonas de reacción estaban situadas sobre la superficie del microchip como una matriz de 4 x 4. Cada zona de reacción tenía la forma de tronco de pirámide, con las dimensiones de la base superior de 2 x 2, la base inferior de 1,7 x 1,7 mm y la profundidad de 0,4 mm. Toda la zona del sustrato de silicio se cubrió con dióxido de silicio SiO<sub>2</sub> por oxidación termoquímica. El sustrato de silicio cubierto con el dióxido de silicio se limpió en una mezcla de ácido sulfúrico concentrado y peróxido de hidrógeno (3:1) durante 20 minutos. Después de un lavado profundo con agua semidesionizada y de secado, la superficie del sustrato de silicio fuera de las zonas de reacción se trató con polimetilmetoxisiloxano "Penta-111" (Penta-North, Rusia). Después de la polimerización en el tratamiento térmico, la superficie de las zonas de reacción se trató primero con 3-glicidoxipropiltrimetoxisilano (Sigma, Estados Unidos de América) durante 60 minutos y luego con etilenglicol diglicidil éter (Sigma, Estados Unidos de América) durante 60 minutos. Este sustrato se encoló después a la barrera periférica de poliacrilato de 3 mm de grosor.

Según los cálculos, la masa térmica total del microchip con las muestras de las zonas de reacción y el líquido aislante se estimó en 3,35 J/K. La conductancia térmica del sustrato de silicio se estimó en 175 W/K. Al mismo tiempo, la relación de la masa térmica total del microchip a la conductividad térmica del sustrato de microchip no excedía de 0,02 s.

El microchip fue tratado por radiación UV durante 5 minutos con posterior cobertura de la superficie superior de la barrera periférica con una película polimérica protectora para evitar la contaminación de la superficie de las zonas de

reacción durante el almacenamiento y el manejo del microchip. De esta forma, el microchip podía almacenarse a temperatura ambiente durante varios meses.

5 Según la presente invención, los diodos fotoemisores XL9030 (Cree, Estados Unidos de América) sirvieron como las fuentes de emisión en el dispositivo, cámara CCD MultiBlue (Perkin-Elmer Optoelectronics, Estados Unidos de América) como un detector, filtros de luz de interferencia XF-52 (Omega Optical, Estados Unidos de América)- en el bloque de filtración de emisión. El dispositivo Peltier (40W, Cryotherm, Rusia) se usó en el bloque de ciclo térmico, y se utilizó un ordenador personal con software instalado como el sistema de control.

10 Se prepararon las soluciones siguientes para PCR en tiempo real:

1) Mezcla de amplificación conteniendo:

15 80 mM Tris-HCl (pH=8,0), 0,1% Triton X-100, 5% glicerol (Sigma, Estados Unidos de América), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 24 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,5 mM EDTA, desoxinucleótido trifosfos dATP, dTTP, dGTP, dCTP de 500 μM cada uno, OligoTaq DNA-polimerasa 0,1 U/μl (Promega, Estados Unidos de América); oligonucleótidos iniciadores directos e inversos en la concentración de 0,5 μM, sonda de oligonucleótido etiquetada con fluorescencia en la concentración de 0,2 μM para detección de Escherichia coli, cepa C600, fragmento de gen 16S pRNA, agua desionizada estéril.

20 2) Solución de muestra conteniendo 10<sup>4</sup> ADN de copias de Escherichia coli a 1 μl, cepa C600, en agua desionizada estéril (muestra K+). Se usó agua desionizada estéril (muestra K-) como la muestra no conteniendo ADN específico.

25 Las soluciones recién preparadas se mezclaron en la relación de 1:1, mezclaron con una mezcladora de vibración y pipeteado y luego se centrifugaron. La mezcla PCR de trabajo obtenida se utilizó para introducción a las zonas de reacción del microchip.

30 La capa aislante de cobertura compuesta de 100 μl de silicio líquido PMS-200 (Penta-North, Rusia) se introdujo sobre la superficie superior del microchip limitada por la barrera periférica por medio de una micropipeta. El líquido sirvió como el líquido aislante. A través de esta capa de aislamiento se introdujeron 2 μl de la mezcla PCR de trabajo por medio de una micropipeta. La mezcla se dispersó fácilmente a las zonas de reacción, no se difundió sobre la superficie de sustrato evitando así la contaminación mutua debido a las propiedades de la superficie hidrófila en las zonas de reacción y las propiedades hidrófobas de la superficie fuera de las zonas de reacción.

35 El ciclo térmico se realizó en las condiciones de temperatura recomendadas por el fabricante de los reactivos: activación de polimerasa a 94°C durante 180 segundos (1 ciclo), desnaturalización de ADN a 94°C durante 20 segundos, recocido de iniciador a 58°C durante 40 segundos, elongación de amplicones y captador de señal de fluorescencia a 72°C durante 20 segundos (45 ciclos).

40 El resultado del análisis rt-PCR se representa en la figura 4. Es típico de las curvas rt-PCR que en las etapas iniciales la intensidad de fluorescencia es pequeña y prácticamente no cambia. Este nivel de fluorescencia se denomina el nivel base. El indicador de la acumulación del producto de reacción es el denominado "ciclo umbral", es decir, el ciclo en el que la intensidad de la fluorescencia empieza a superar el nivel base. La figura 4 muestra que las muestras conteniendo el ADN de interés exhiben un aumento de la señal de fluorescencia mientras que la fluorescencia de las muestras que no contienen este ADN permanece en el nivel base.

45 La comparación del valor medio de los ciclos umbral (Ct) obtenido en las soluciones del ejemplo presente usando el dispositivo según la invención (Ct = 31,3) y los ciclos umbral obtenidos usando la instrumentación comercialmente disponible SmartCycler II (Cepheid, Estados Unidos de América) con condiciones de ciclo térmico completamente análogas (Ct = 31,0) muestra que las características analíticas del dispositivo según la invención y el equipo comercialmente disponible son comparables.

50 Al mismo tiempo, las tasas máximas de calentamiento y enfriamiento para el dispositivo según la invención eran 16,5 y 14,3°C/s, correspondientemente, que eran 4 y 8 veces más altas, respectivamente, en comparación con la instrumentación comercialmente disponible, y 2 y 5 veces más altas en comparación con las muestras más rápidas del equipo comercialmente disponible.

55 El tiempo empleado en el ejemplo presente para lograr el ciclo umbral usando el dispositivo según la invención fue 53,1 min.

## 60 Ejemplo 2

El microchip y el dispositivo según la invención eran similares a los descritos en el ejemplo 1.

65 Las soluciones preparadas para rt-PCR eran similares al ejemplo 1. La preparación de la mezcla PCR de trabajo y su introducción en las zonas de reacción del microchip se realizaron de forma similar al ejemplo 1.

El ciclo térmico se realizó en las condiciones de temperatura con duración reducida de las etapas de desnaturalización, recocido de iniciador y elongación: activación de polimerasa a 94°C durante 120 s (1 ciclo), desnaturalización de ADN a 94°C durante 3 s, recocido de iniciador a 58°C durante 3 s, elongación de amplicones y captador de señal de fluorescencia a 72°C durante 8 s (45 ciclos).

El resultado del ejemplo se muestra en la figura 5. La figura representa que las muestras conteniendo el ADN bajo investigación exhiben un aumento de las señales de fluorescencia mientras que las muestras que no contienen este tipo de ADN no muestran el aumento de la señal de fluorescencia. La comparación entre los ciclos umbral (Ct) obtenidos usando el dispositivo según la invención con las condiciones de temperatura recomendadas por los fabricantes de los sistemas de prueba Ct = 31,3 y usando las condiciones de temperatura con duración acortada de las etapas PCR Ct = 31,9 muestra que la efectividad de la reacción PCR en las condiciones acortadas de temperatura cambia de forma insignificante.

El tiempo para llegar al ciclo umbral en el ejemplo presente fue solamente 18 min usando el dispositivo según la invención, que es 3 veces más rápido en comparación con el uso de uno de los analizadores PCR más rápidos comercialmente disponible, Smart Cycler II (54,7 min).

### Ejemplo 3

El microchip y el dispositivo según la invención eran similares a los descritos en el ejemplo 1.

Se prepararon las soluciones siguientes para la rt-PCR:

1) Mezcla de amplificación conteniendo 80 mM Tris-HCl (pH=8,0), 0,1% Triton X-100, 24 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,5 mM EDTA, desoxinucleótido trifosfatos dATP, dTTP, dGTP, dCTP de 500 μM cada uno, 0,16% D-glucosa, 1,6 % inulina, 8% D-manitol (Sigma, Estados Unidos de América), OligoTaq DNA-polimerasa 0,1 U/μl (Promega, Estados Unidos de América); iniciadores directos e inversos en la concentración de 0,5 μM, sonda de oligonucleótido etiquetada con fluorescencia en la concentración de 0,2 μM para detección del ADN de Escherichia coli, cepa C600, fragmento de gen 16S pRNA, agua desionizada estéril.

2) Solución de muestra conteniendo 10<sup>4</sup> ADN de copias de Escherichia coli en 1 μl, cepa C600, en agua desionizada estéril (muestra K+) o agua desionizada estéril (muestra K-) en la solución conteniendo 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris-HCl (pH=8,0), 0,1% Triton X-100, 5% glicerol (Sigma, Estados Unidos de América) y agua desionizada estéril.

Se introdujo 1 μl de mezcla de amplificación preparada según el punto 1 del ejemplo presente a cada una de las 16 zonas de reacción del microchip. La mezcla se secó en una campana de flujo laminar a temperatura ambiente durante 2-3 horas hasta que se formó una capa densa firmemente retenida en las zonas de reacción. La superficie superior de la barrera periférica se recubrió con una película polimérica protectora con una capa adhesiva que aislaba las zonas de reacción de la atmósfera para evitar la contaminación de la superficie de las zonas de reacción durante el almacenamiento y el manejo del microchip. De esta forma, el microchip podía almacenarse a temperatura ambiente durante varias semanas.

Para el análisis PCR, la solución de la muestra según el punto 2 del ejemplo presente se introdujo en las zonas de reacción del microchip de forma similar al ejemplo 1.

El ciclo térmico se realizó en las condiciones de temperatura recomendadas por el fabricante de los reactivos: activación de polimerasa a 94°C durante 180 s (1 ciclo), desnaturalización de ADN a 94°C durante 20 s, recocido de iniciador a 58°C durante 40 s, elongación de amplicones y captador de señal de fluorescencia a 72°C durante 20 s (45 ciclos).

Como resultado se obtuvieron curvas rt-PCR (datos no disponibles) que muestran que las muestras conteniendo el ADN deseado exhiben señal de fluorescencia incrementada mientras que en las muestras que no contienen el ADN deseado la señal de fluorescencia no aumenta. El experimento identificó que la cantidad de los consumibles, costos de personal y tiempo empleado en la realización de las operaciones preparatorias para la preparación de la muestra y la introducción de las mezclas obtenidas a las zonas de reacción disminuía considerablemente con el uso del método y el dispositivo según la presente invención en comparación con equipo convencional. Por ejemplo, la cantidad de reactivos PCR se redujo 12 veces, la cantidad de las puntas de dosímetro disminuyó 6 veces, la cantidad de etapas de pipeteado disminuyó dos veces, el tiempo requerido para operaciones preparatorias se redujo 4 veces.

Puede afirmarse que las ventajas importantes de la presente invención que dan lugar a la realización de la tarea establecida son:

1. Mayor tasa del ciclo térmico de la muestra debido al uso de materiales con alta conductividad térmica así como debido al contacto de la muestra con la superficie de la zona de reacción;

2. Eliminación de inhibición de PCR debido a la capa pasivante de la superficie de las zonas de reacción, que incrementa la sensibilidad, la exactitud y la fiabilidad del análisis;

5 3. Reducida intensidad de personal y costo del análisis PCR debido al uso del microchip conteniendo reactivos PCR secados.

10 Anteriormente se han presentado ejemplos preferidos de la implementación de la invención que no limitan la esencia ni los límites de la invención, sino que solamente la ilustran. Los especialistas en este campo hallarán fácilmente varias modificaciones y mejoras de la invención propuesta que también caen dentro de su alcance reflejado en la reivindicación de la invención.

## REIVINDICACIONES

1. El método de identificación de ácidos nucleicos por una reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real incluyendo
- 5 - introducción de muestras líquidas conteniendo ácido nucleico a zonas de reacción (1) sobre la superficie superior de un sustrato termoconductor (3) de un microchip (10);
- 10 - aislamiento de las muestras introducidas (2) de la atmósfera;
- contacto del ácido nucleico de la muestra (2) con componentes de la reacción en cadena de la polimerasa durante el ciclo térmico de las muestras (2) con extracción de calor a través de la superficie exterior del microchip (10);
- 15 - detección fluorescente del cambio de la cantidad de los productos de reacción en cadena de la polimerasa durante el ciclo térmico;
- identificación de la cantidad del ácido nucleico inicial en las muestras (2) por la dinámica de crecimiento de la señal fluorescente,
- 20 **caracterizado porque**
- el microchip (10) se usa con el sustrato termoconductor (3) con el coeficiente de conductividad térmica superior a 1 W/cm-K y con el coeficiente de difusividad térmica superior a 0,6 cm<sup>2</sup>/s,
- 25 donde las dimensiones de la zona de reacción se eligen desde el rango de 10<sup>1</sup>-10<sup>4</sup> μm en longitud y anchura y 10<sup>1</sup>-10<sup>3</sup> μm en profundidad, preferiblemente, 5 x 10<sup>2</sup>-5 x 10<sup>3</sup> μm en longitud y anchura, y 2x10<sup>2</sup>-5x10<sup>2</sup> μm en profundidad,
- 30 donde las zonas de reacción (1) sobre la superficie del microchip (10) están separadas del sustrato termoconductor (3) por una capa de un material pasivante (4) que está unido de forma covalente a la superficie del sustrato termoconductor (3) mientras que las muestras introducidas (2) están aisladas separándolas de la atmósfera por una capa de líquido (5) inmiscible con agua que se retiene sobre la superficie superior del sustrato termoconductor (3) por medio de una barrera periférica (6), no excediendo de 0,04 s la relación de la masa térmica agregada del microchip (10) con muestras introducidas (2) y la capa del líquido (5) inmiscible con agua a la conductancia térmica
- 35 del sustrato de microchip (3), donde un material del sustrato termoconductor (3) es aluminio.
2. El método según la reivindicación 1, **caracterizado porque** la identificación fluorescente del cambio de la cantidad de los productos de reacción en cadena de la polimerasa en las muestras (2) durante el ciclo térmico se realiza exponiendo las muestras (2) a radiación con un rango espectral seleccionado de 350-700 nm y registro de la
- 40 señal de fluorescencia en el rango espectral seleccionado de 450-1000 nm.
3. El método según la reivindicación 1, **caracterizado porque** el material pasivante (4) es óxido de silicio u óxido metálico o polimetilmtoxissiloxano o 3-glicidoxipropil-trimetoxissilano con etilenglicol diglicidil éter.
- 45 4. El método según la reivindicación 1, **caracterizado porque** la introducción de muestras líquidas (2) a las zonas de reacción (1) se lleva a cabo a través de un líquido (5) inmiscible con agua.
5. El método según la reivindicación 1, **caracterizado porque** el material pasivante sobre la superficie del microchip (10) en las zonas de reacción (1) es un material hidrófilo (7) mientras que el material pasivante sobre la superficie
- 50 del microchip (10) entre las zonas de reacción (1) es un material hidrófobo (8).
6. El método según la reivindicación 1, **caracterizado porque** el material pasivante (7) sobre la superficie del microchip en las zonas de reacción es 3-glicidoxi-propil-trimetoxissilano con etilenglicol diglicidil éter y el material pasivante (8) sobre la superficie del microchip entre las zonas de reacción es polimetilmtoxissiloxano.
- 55 7. El método según la reivindicación 1, **caracterizado porque** se utiliza una capa de un líquido (5) inmiscible con agua, siendo al menos 10% la tasa de transmisión en el rango espectral seleccionado de radiación y en el rango espectral seleccionado de fluorescencia y no superando su señal de fluorescencia 10% de la señal creada por las
- 60 muestras (2) colocadas en las zonas de reacción (1).
8. El método según la reivindicación 1, **caracterizado porque** el líquido (5) inmiscible con agua es un líquido de polimetilmtoxissiloxano con una densidad inferior a la densidad de agua.
9. El método según la reivindicación 1, **caracterizado porque** uno o varios componentes de la reacción en cadena
- 65 de la polimerasa en forma de una solución acuosa es aplicado sobre la capa del material pasivante (4) sobre la superficie del microchip (10) en las zonas de reacción (1) y la solución se seca, por ejemplo, por medio de

liofilización.

5 10. El dispositivo para identificación de ácidos nucleicos por el método de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real conteniendo un microchip (10) con al menos una zona de reacción (1) en su superficie que está unida de forma mecánica al soporte de microchip (11) y unida de forma óptica al detector de fluorescencia (13) mediante el bloque de filtración del canal de radiación (18) incluyendo al menos una fuente de radiación (14) unida de forma óptica al bloque de filtración de la radiación del canal de iluminación (15) y el microchip (10) así como un sistema de control (19) unido eléctricamente al bloque de ciclo térmico (12) que está unido térmicamente al microchip (10) y se fabrica con la posibilidad de calentar, enfriar y mantener la temperatura del microchip (10), **caracterizado porque** el microchip (10) contiene un sustrato termoconductor (3) unido térmicamente al bloque de ciclo térmico (12) y hecho de un material con el coeficiente de conductividad térmica superior a  $1 \text{ W/cm}\cdot\text{K}$  y el coeficiente de difusividad térmica superior a  $0,6 \text{ cm}^2/\text{s}$ ,

15 donde las dimensiones de la zona de reacción se elige desde el rango de  $10^1\text{-}10^4 \mu\text{m}$  en longitud y anchura y  $10^1\text{-}10^3 \mu\text{m}$  en profundidad, preferiblemente,  $5 \times 10^2\text{-}5 \times 10^3 \mu\text{m}$  en longitud y anchura, y  $2 \times 10^2\text{-}5 \times 10^2 \mu\text{m}$  en profundidad, mientras que cada zona de reacción (1) está separada del sustrato termoconductor (3) por una capa del material pasivante (4) unido de forma covalente a la superficie del sustrato termoconductor (3), teniendo la superficie superior del microchip (10) una barrera periférica (6) con la posibilidad de retener la cantidad asignada del líquido (5) inmiscible con agua sobre la superficie superior del microchip (10) y no superando  $0,04 \text{ s}$  la relación de la masa térmica agregada del microchip (10) con las muestras introducidas (2) y la capa del líquido (5) inmiscible con agua a la conductancia térmica del sustrato de microchip (3), donde un material del sustrato termoconductor (3) es aluminio.

25 11. El dispositivo según la reivindicación 10, **caracterizado porque** la fuente de radiación (14) es al menos un diodo fotoemisor o una matriz de diodos fotoemisores.

30 12. El dispositivo según la reivindicación 10, **caracterizado porque** el sistema de control (19) se realiza con la posibilidad de conmutar fuentes de radiación (14) entre sí y con la posibilidad de cambiar el rango espectral del bloque (o bloques) de filtración de radiación (15, 18).

35 13. El dispositivo según la reivindicación 10, **caracterizado porque** el detector de fluorescencia (13) es un detector de matriz o un multiplicador de fotoelectrones, o un fotodiodo.

40 14. El dispositivo según la reivindicación 10, **caracterizado porque** el bloque de ciclo térmico (12) incluye el dispositivo Peltier.

45 15. El dispositivo según la reivindicación 10, **caracterizado porque** el microchip (10) se realiza de modo que la superficie del microchip (10) en las zonas de reacción (1) se cubra con una capa de un material pasivante hidrófilo (7) y la superficie del microchip (10) entre las zonas de reacción (1) se cubra con un material pasivante hidrófobo (8).

50 16. El dispositivo según la reivindicación 10, **caracterizado porque** el microchip (10) se realiza de modo que las zonas de reacción (1) sobre la superficie del microchip (10) sobre la capa del material pasivante (4, 7) contengan uno o varios componentes secados de la reacción en cadena de la polimerasa.

17. El dispositivo según la reivindicación 10, **caracterizado porque** la barrera periférica (6) se realiza con la posibilidad de aislamiento de las zonas de reacción (1) de la atmósfera por medio de una película adhesiva.

18. El dispositivo según la reivindicación 10, **caracterizado porque** el sistema de control (19) se realiza con la posibilidad de conmutación automática de las fuentes de radiación (14) y los bloques de filtración de radiación de luz (15) y recogida (18) de señales del detector de radiación (13) sincronizado con estos conmutadores.

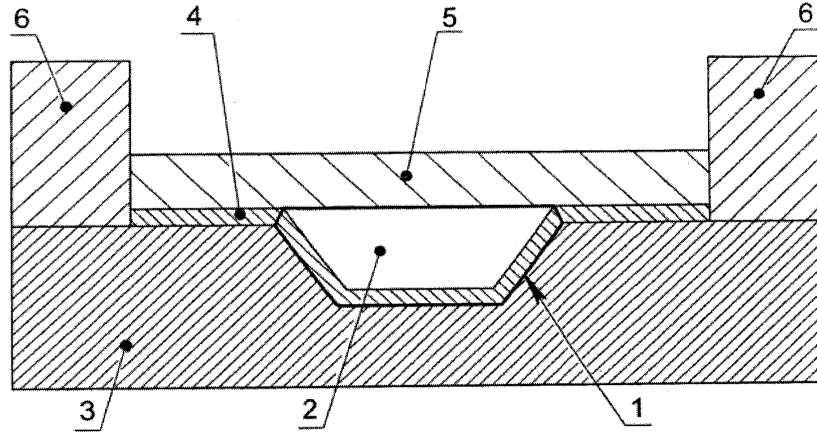


Fig. 1

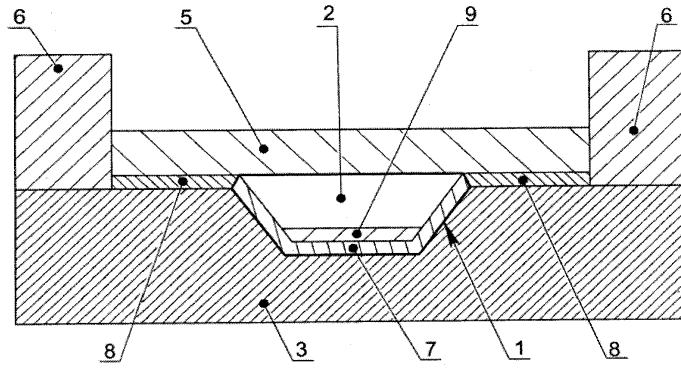


Fig. 2



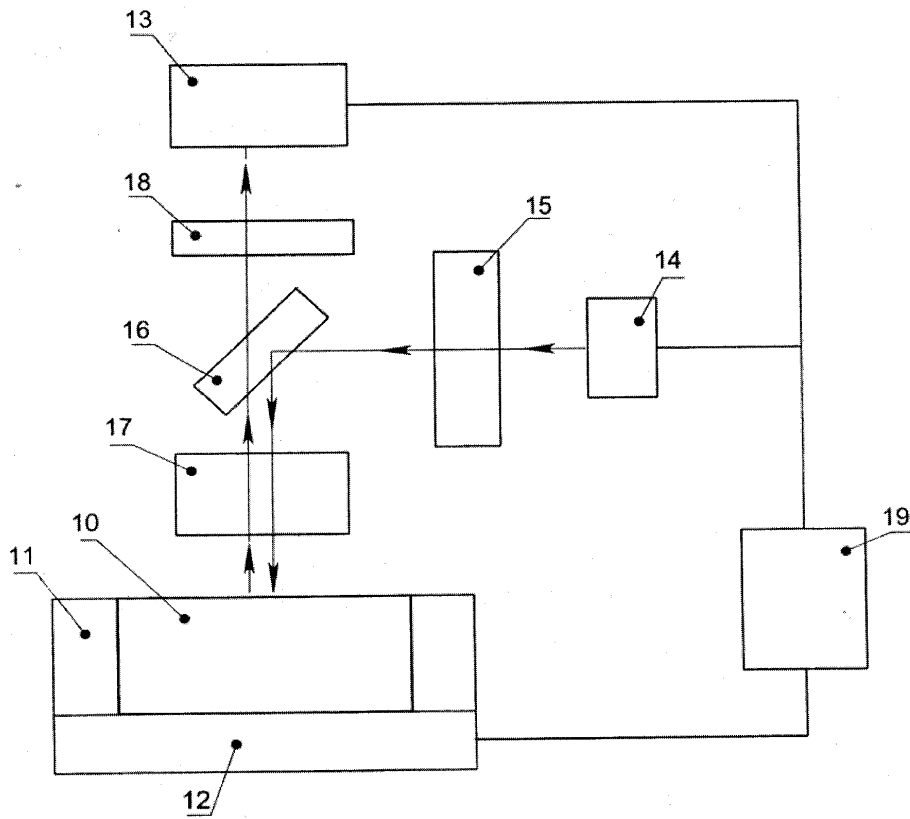


Fig. 3

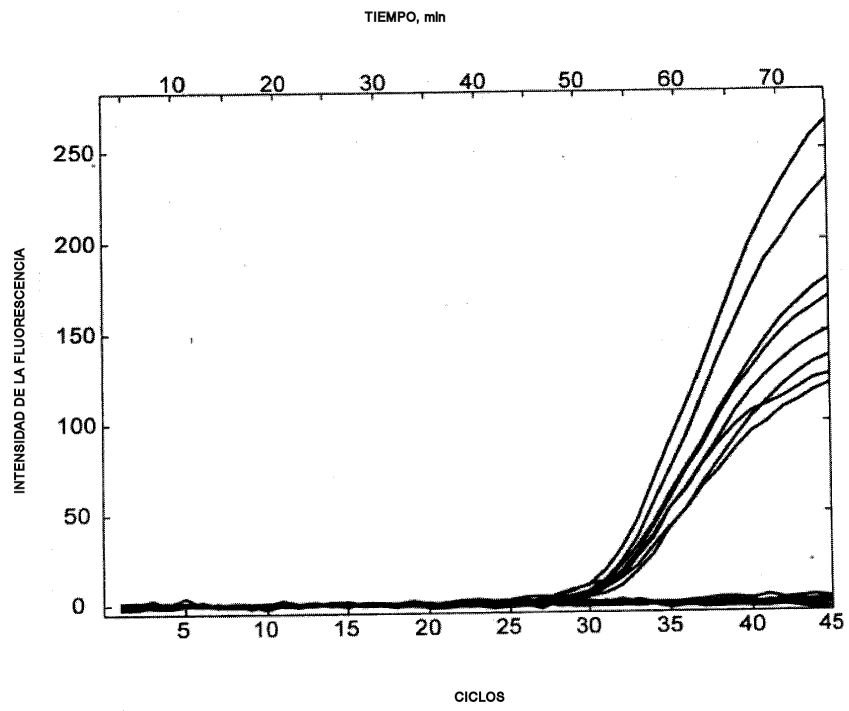


Fig. 4

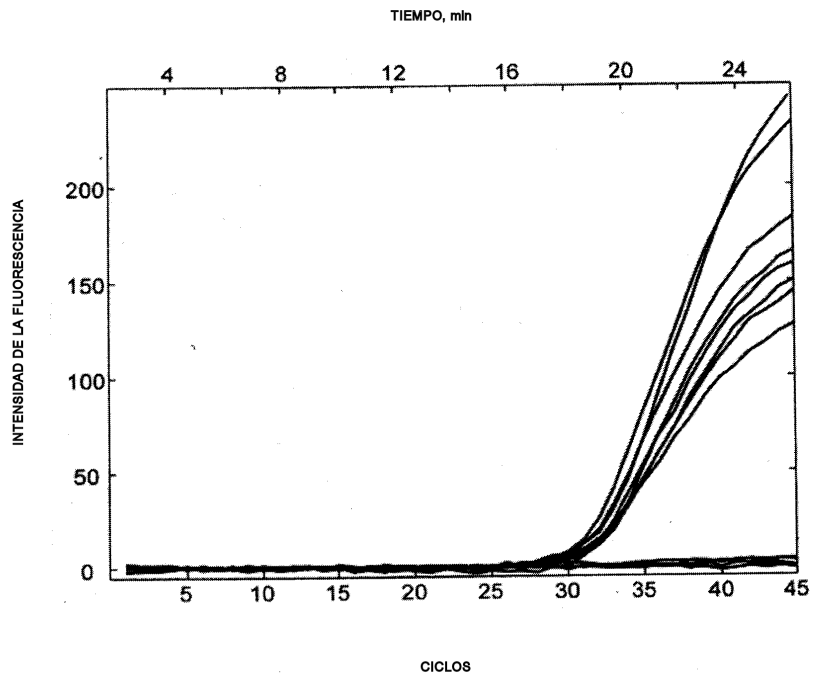


Fig. 5