

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 727 785**

51 Int. Cl.:

B01J 19/00 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 37/00 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.05.2004 PCT/JP2004/007060**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.11.2004 WO04102194**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.05.2004 E 04733682 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.04.2019 EP 1626276**

54 Título: **Soporte que tiene una sustancia de unión selectiva fijada al mismo**

30 Prioridad:

19.05.2003 JP 2003140016
16.12.2003 JP 2003417661

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.10.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

NAGINO, KUNIHISA;
NAKAMURA, FUMIO y
NOBUMASA, HITOSHI

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 727 785 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

Soporte que tiene una sustancia de unión selectiva fijada al mismo

5 **Campo técnico de la invención**

La presente invención se refiere a un soporte que tiene una sustancia inmovilizada que se une selectivamente a una sustancia analito ("sustancia de unión selectiva" en la presente memoria descriptiva).

10 **Técnica antecedente de la invención**

Junto con el avance en la investigación sobre el análisis de la información genética de distintos organismos vivos, se ha vuelto disponible rápidamente más información sobre el número de genes que incluyen los genes humanos y sus secuencias de bases, así como las proteínas codificadas por las secuencias genéticas y las cadenas de azúcares y las proteínas producidas secundariamente. Las funciones de las macromoléculas tales como un gen, proteína y cadena de azúcar con distintas secuencias se pueden estudiar por distintos métodos. Por ejemplo, en los ácidos nucleicos, principalmente, la relación entre distintos genes y sus funciones biológicas se pueden estudiar, por ejemplo, utilizando la complementariedad de un ácido nucleico y otro ácido nucleico tal como por hibridación de Northern o hibridación de Southern. Para las proteínas, es posible estudiar la función y expresión proteicas por métodos que utilizan la interacción proteína/proteína tal como la hibridación de Western.

En años recientes, se ha desarrollado un método o metodología de ensayo nuevos que han atraído la atención recientemente como un método de análisis de la expresión de múltiples genes al mismo tiempo. Todos estos métodos tienen el mismo principio como métodos convencionales, debido a que son métodos de detección y cuantificación de ácidos nucleicos basados en la reacción de hibridación entre los ácidos nucleicos y se pueden aplicar a la detección y cuantificación de proteínas y cadenas de azúcar basándose en la interacción entre proteína/proteína, cadena de azúcar/cadena de azúcar, o cadena de azúcar/proteína. Estos métodos se caracterizan porque se utiliza una pieza plana de sustrato cristalino llamado micromatriz o chip, que tienen múltiples fragmentos de ADN, o cadenas de azúcar que se inmovilizan de manera densa. Ejemplos típicos del uso de los métodos de micromatriz incluyen un método de hibridación de un gen que se expresa en la células analito con una muestra marcada, por ejemplo, un fluorocromo en un sustrato plano, que permite que los ácidos nucleicos (ADN o ARN) complementarios mutuamente se unan entre ellos, y la detección de los sitios de unión rápidamente en un analizador de alta resolución, y un método de detección de la respuesta tal como el cambio en la corriente eléctrica debido a una reacción electroquímica. De esta manera, es posible estimar las cantidades de los genes presentes en la muestra.

Por ejemplo, la Publicación Nacional de Solicitud de Patente Japonesa (abierta a inspección pública) N.º 10-503841 (Reivindicaciones) desvela un método de revestimiento de poli-L-lisina, aminosilano, o similares en un sustrato plano tal como un cubreobjetos de cristal y la inmovilización de ácidos nucleicos utilizando un dispositivo de aplicación puntual llamado punteador, como método para la inmovilización de un ácido nucleico en un sustrato.

De manera alternativa, por ejemplo, la Solicitud de Patente Japonesa Abierta a inspección pública (JP-A) N.º 2001-108683 desvela un método de utilización de oligo-ADN (un oligo-ADN es un ADN que tienen un número de bases de 10 a 100) como sondas de ácido nucleico utilizadas en un chip de ADN (ácidos nucleicos inmovilizados en un sustrato) en vez del método convencional que utiliza ADNc y fragmentos de los mismos que tienen longitudes de bases de cientos de miles, para la reducción de errores durante la detección y la conveniencia de la síntesis en un sintetizador. En el método, los oligo-ADN se unen a la placa de cristal covalentemente.

Además del cristal, hay algunas propuestas de utilización de sustratos de resina, como material utilizado como sustrato para el chip de ADN. Por ejemplo, el documento JP-A N.º 2001-337089 (párrafo 17) describe un polímero de polimetil metacrilato. Sin embargo, el documento JP-A N.º 2001-337089 desvela un método no específico de inmovilización de ADN. Además, la JP-A N.º 2003-130874 (párrafo 12) también tiene una descripción similar y desvela un método no específico de inmovilización de ADN. El documento JP-A N.º 2002-71693 (párrafo 7) desvela un método de modificación de una fibra que contiene un grupo nitrilo tal como una fibra acrílica en una fibra que contiene un grupo carboxilo mediante un tratamiento con un álcali y la inmovilización de ADN o similares por unión de grupos carboxilo. Sin embargo, la fibra con el álcali, que contiene poliacrilonitrilo como el componente principal tiene el problema de que tiene una autofluorescencia propia alta y no es adecuada como sustrato. Adicionalmente, el documento JP-A N.º 2002-71693 (párrafo 7) desvela un método de modificación de polimetacrilato mediante copolimerización con ácido acrílico o ácido metacrílico en una fibra que contiene un grupo carboxilo y que permite que los grupos carboxilos se unan al ADN, pero el método tiene la desventaja de que el sustrato (soporte) tiene una pequeña cantidad de grupos carboxilo de superficie dando lugar a la disminución de la cantidad de ADN inmovilizado y en consecuencia una intensidad insuficiente de la señal después de la hibridación.

El documento WO 01/67104 A2 desvela superficies de polímeros funcionalizados que tienen restos reactivos en ellas que se ponen en contacto con sellos que tienen ligandos adsorbidos en ellos, los ligandos también comprenden restos reactivos. Los restos reactivos de las superficies funcionalizadas y los ligandos forman enlaces covalentes,

proporcionando de esta manera un método de microsellado de las superficies de polímero directamente con ligandos tales como ligandos biológicos. Utilizando este método, se pueden fabricar dispositivos tales como placas de cultivo tisular con superficies de polímeros que están microselladas directamente con ligandos.

5 El documento WO 03/016868 A2, se refiere a composiciones de sensores que comprenden una matriz compuesta por matrices individuales, para permitir el procesamiento simultáneo de varias muestras. Adicionalmente se proporcionan métodos de fabricación y utilización de matrices compuestas, así como una cámara de hibridación para su uso con una matriz compuesta.

10 El documento EP 0 895 082 A2 desvela un método de aplicación puntual densa y eficazmente una sonda en una superficie de un soporte sólido. Se une un líquido que contiene una sonda a un soporte sólido como gotas para formar puntos que contienen la sonda del soporte sólido mediante un método de inyección de tinta.

15 El documento US 2003/044799 A1 se refiere a la producción de una micromatriz de muestras para su uso en la detección de uno o más biopolímeros en la muestra. La micromatriz de muestras se forma distribuyendo cantidades equivalentes de muestras únicas en localizaciones separadas, definidas espacialmente sobre un sustrato. Cada sitio de la micromatriz, por lo tanto, tiene la misma composición de biopolímeros diana. La micromatriz es interrogada entonces por una o más sondas específicas de uno o más de los biopolímeros diana.

20 El documento JP 2003-130879 A describe un chip de ADN que se fabrica fijando un fragmento de ADN a una superficie del vehículo de fase sólida, el vehículo de fase sólida se puede construir de material de resina, y siendo la superficie del vehículo de fase sólida y el fragmento de ADN fijada mediante un polímero de injerto unido a la superficie del vehículo de fase sólida. El polímero de injerto tiene un grupo funcional reactivo capaz de unirse al fragmento de ADN en su cadena lateral.

25

Sumario de la invención

Los problemas que se tienen que superar en la resolución de la presente invención son los siguientes: Primero, la inmovilización de un oligo-ADN en un sustrato plano de cristal da lugar a los siguientes problemas: 1) Un problema es que la muestra de ADN a menudo se adsorbe de manera no específica en una área distinta de los puntos en los que la sonda de ADN está inmovilizada durante la hibridación debido a que el cristal es hidrófilo y la muestra adsorbida inespecíficamente también se detecta durante la detección de fluorescencia con un dispositivo llamado escáner, dando como resultado un aumento del ruido. 2) Un problema es que la eficacia de hibridación con la muestra de ADN es baja, la intensidad de la señal es baja, y en consecuencia la relación S/N es insuficiente debido probablemente a que el grado de libertad espacial del oligo-ADN unido covalentemente está restringido debido a la rigidez del cristal.

Un objetivo de la presente invención es proporcionar un soporte que tenga un ADN inmovilizado firmemente unido a un sustrato de resina en un estado más alto de eficacia de hibridación. Otro objetivo de la misma es proporcionar un soporte que tenga una sustancia de unión selectiva inmovilizada que sea resistente al deterioro en la relación S/N y tenga una sensibilidad de detección mayor.

La presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas. A saber, la presente invención proporciona un soporte que tiene inmovilizada una sustancia de unión selectiva, donde el soporte tiene una parte con una depresión que incluye múltiples proyecciones, la superficie del soporte comprende una resina de autofluorescencia baja que tiene una intensidad de fluorescencia de 1.000 o menos, la superficie de la resina comprende grupos carboxilo formados por el tratamiento de la resina con un álcali o ácido, y adicionalmente se inmoviliza una sustancia de unión selectiva en las superficies planas superiores de las múltiples proyecciones de la parte con una depresión que incluye múltiples proyecciones mediante los grupos carboxilo de la resina, donde el soporte tiene formada un área plana, y la diferencia de altura entre la superficie plana superior e las proyecciones den la parte con una depresión que incluye múltiples proyecciones y la superficie del área plana es de 50 μm o menos, donde la intensidad de fluorescencia de la resina de baja fluorescencia se determina midiendo una placa plana limpia de la misma que tiene un grosor de 1 mm utilizando GenePix 4000B fabricado por Axon Instruments en condiciones de una longitud de onda de excitación de 532 nm, una ganancia de fotomultiplicador fijada en 700 y un poder de láser del 33 %.

La presente invención proporciona un soporte que tiene inmovilizada una sustancia de unión selectiva menor en cuanto a la adsorción de muestra no específica, mayor en cuanto a la eficacia de hibridación, y, en consecuencia, superior en la relación S/N.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un gráfico que ilustra un esquema de reacción para la inmovilización de una sustancia de unión selectiva en una superficie de PMMA.

65 La Figura 2 es una vista esquemática que ilustra un soporte de acuerdo con la presente invención.

La Figura 3 es una vista transversal esquemática de la sección del soporte de acuerdo con la presente invención.

La Figura 4 es un gráfico que ilustra una plantilla para sujetar una micromatriz.

La Figura 5 es una vista transversal de la sección de la parte con una depresión.

La Figura 6 es un diagrama esquemático que ilustra un soporte que tiene una capa de soporte y una capa que tiene inmovilizada una sustancia de unión selectiva.

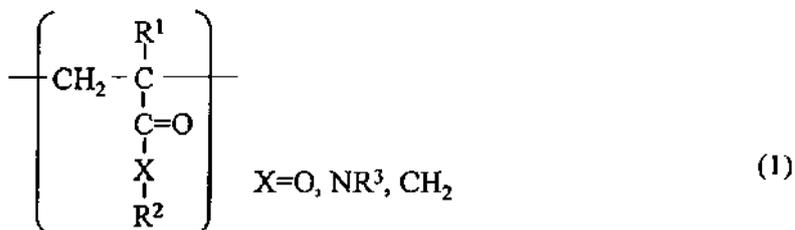
La Figura 7 es un gráfico que ilustra el esquema de reacción para la inmovilización de una sustancia de unión selectiva en una superficie de cristal.

Mejor modo de llevar a cabo la invención

De aquí en adelante se describirá el soporte que tiene inmovilizada una sustancia de unión selectiva de acuerdo con la presente invención.

El soporte que tiene inmovilizada una sustancia de unión selectiva de acuerdo con la presente invención comprende la superficie del soporte que comprende una resina de fluorescencia baja y la superficie de la resina se trata con un álcali o un ácido, que forman grupos carboxilo, es decir, la superficie de la resina comprende grupos carboxilo formados por el tratamiento de la resina con un álcali o un ácido. La resina de fluorescencia baja es una resina que tiene una intensidad de fluorescencia de 1.000 o menos, como se determina midiendo una placa plana limpia que tiene un grosor de 1 mm utilizando GenePix 4000B fabricado por Axon Instruments en condiciones de una longitud de onda de excitación de 532 nm, una ganancia de fotomultiplicador fijada en 700 y una potencia de láser del 33 %. Las resinas que no satisfacen los requisitos anteriores son indeseables debido al deterioro de la relación S/N durante la detección.

Ejemplos de dichas resinas incluyen los polímeros que contienen la unidad estructural representada por la siguiente fórmula general (1):



en la Fórmula general (1), R¹, R² y R³ representan cada una un grupo alquilo o arilo o un átomo de hidrógeno.

El polímero puede ser un homopolímero o un copolímero. Se utiliza al menos un tipo de monómero como material en bruto para el polímero, y el monómero está presente como un enlace doble para la polimerización de un grupo funcional para la policondensación, cetona o ácido carboxílico o el derivado de los mismos. El polímero tiene más preferentemente la estructura representada por la Fórmula general (1).

Cuando el polímero es un copolímero, el polímero contiene preferentemente la unidad estructural representada por la Fórmula general (1) en una cantidad del 10 % o más con respecto al total de unidades de monómero. Cuando el contenido de la unidad estructural representada por la fórmula general (1) es del 10 % o más, es posible que se formen más grupos carboxilo en la superficie y se inmovilizan más sondas de ácido nucleico en las etapas descritas posteriormente, dando lugar a una mejora de la relación S/N.

El polímero de la presente invención es un compuesto que tiene un grado de polimerización promediado de 50 o más. El grado de polimerización promediado del polímero estará preferentemente en el intervalo de 100 a 10.000 y en particular preferentemente de 200 o más y 5.000 o menos. El grado de polimerización promediado se puede determinar fácilmente midiendo el peso molecular de un polímero de acuerdo a un método común mediante GPC (cromatografía de penetración en gel).

En la Fórmula general (1), R¹ y R² representan cada una un grupo alquilo o arilo o un átomo de hidrógeno, y pueden ser iguales o distintas entre ellas. El grupo alquilo puede ser un grupo de cadena lineal o ramificada, y preferentemente tiene de 1 a 20 átomos de carbono. El grupo arilo tiene preferentemente de 6 a 18 átomos de carbono, más preferentemente de 6 a 12 átomos de carbono. El grupo funcional X se selecciona arbitrariamente de entre O, NR³ y CH₂. R³ es un grupo funcional definido de manera similar a R¹ y R².

Ejemplos favorables de los polímeros que contienen los grupos descritos anteriormente incluyen los polialquil metacrilatos (PAMA) tal como el polimetil metacrilato (PMMA), polietil metacrilato (PEMA) y el polipropil metacrilato, y similares. Entre estos, es preferible el polimetil metacrilato, desde el punto de vista de que se puede procesar durante el moldeo o grabado en relieve por inyección y una temperatura de transición del cristal relativamente alta. De manera alternativa, también se pueden utilizar el acetato de polivinilo, policiclohexil metacrilato o el polifenil metacrilato, o similares. De otra manera alternativa, también se puede utilizar un copolímero en combinación con los componentes de polímero anteriores o un copolímero en combinación con los componentes de polímero y uno o más componentes de polímero. El otro polímero es, por ejemplo, poliestireno.

5 Cuando se utiliza un copolímero, la relación de monómeros que contienen un grupo carboxilo, por ejemplo, alquil metacrilato, está preferentemente en el intervalo de un 10 % molar o más, debido a que es posible aumentar la cantidad de grupos de ácido carboxílico que se forman en la superficie, aumenta la capacidad de inmovilización de sondas de ácido nucleico, y en consecuencia aumentar la relación S/N. La relación del monómero en las unidades estructurales del polímero es más preferentemente de un 50 % molar o más.

10 Además, en la presente invención, es necesario llevar a cabo un pretratamiento del soporte con un álcali o ácido para la inmovilización de una sustancia de unión selectiva que contiene el polímero que tiene al menos una unidad estructural representada por la Fórmula general (1).

15 De esta manera, se vuelve posible formar grupos carboxilo en la superficie del soporte. Para formar grupos carboxilo en la superficie del soporte, se puede utilizar el tratamiento con un álcali o un ácido solo o en combinación con otro método tal como la sonicación mientras se caliente o exposición a plasma de oxígeno, plasma de argón o radiación con rayos. Entre estos métodos, es preferible desde el punto de vista de la reducción del daño del soporte y la facilidad de procesamiento el método de formación de grupos carboxilo en la superficie por inmersión del soporte en un álcali o ácido calentados. Más específicamente, el soporte se puede sumergir en una solución acuosa de hidróxido sódico o ácido sulfúrico (con una concentración preferida de: 1 a 20 N) preferentemente a una temperatura de 30 °C a 80 °C durante 1 a 100 horas.

20 La formación de grupos carboxilo en la superficie de soporte mediante el método mencionado anteriormente se puede confirmar por XPS (espectroscopia de fotoelectrón de rayos-X). Específicamente, los grupos carboxilo están marcados con fluorina utilizando un reactivo marcador que contiene fluorina (por ejemplo, trifluoroetanol). Es posible entonces estimar la cantidad de los grupos funcionales, a partir de la intensidad de las áreas del pico de Cls y Fls de la muestra marcada posteriormente, tomando en consideración la velocidad de la reacción. Para mejorar adicionalmente la precisión, la formación de grupos carboxilo en la superficie del soporte se puede confirmar determinando la distribución de fluorina en la superficie de una muestra marcada con trifluoroetanol mediante TOF-SIMS (espectrometría de masas de ion secundario con tiempo de vuelo).

25 De esta manera se forman los grupos carboxilo en la superficie del soporte, y sería posible inmovilizar una sustancia de unión selectiva en el soporte, mediante la interacción de avidina-biotina modificando el soporte con biotina o avidina y modificando adicionalmente la sustancia de unión selectiva con avidina o biotina, o de manera alternativa, para inmovilizar una sustancia de unión selectiva, permitiendo que el soporte reaccione con un enlazador tal como etilendiamina y adicionalmente que el enlazador reaccione con la sustancia de unión selectiva. Sin embargo, estos métodos, que necesitan reacciones de dos etapas, a menudo dan como resultado la disminución de la cantidad de la sustancia de unión selectiva inmovilizada en el soporte debido a sus rendimientos de reacción. Por lo tanto, es preferible inmovilizar una sustancia de unión selectiva permitiendo que los grupos carboxilo del soporte reaccionen directamente con los grupos funcionales de la sustancia de unión selectiva. En otras palabras, es preferible inmovilizar una sustancia de unión selectiva mediante enlaces covalentes entre el grupo amino o hidroxilo de la sustancia de unión selectiva y el grupo carboxilo de la superficie del soporte. En general, se utilizaron distintos agentes de condensación tal como diciclohexilcarbodiimida y N-etil-5-fenilsoxazolio-3'-sulfonato para facilitar la reacción de formación de enlaces. Entre estos, la 1-etil-3-(2-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC), que es menos tóxica y se elimina fácilmente del sistema de reacción, es uno de los agentes de condensación más eficaces para la reacción de condensación de una sustancia de unión selectiva con los grupos carboxilo de la superficie de soporte. Otro agente de condensación favorable es el cloruro de 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metil-morfolino (DMT-MM). El agente de condensación, por ejemplo, la EDC, se puede utilizar mezclado en una solución de la sustancia de unión selectiva, o de manera alternativa, se sumerge un soporte que tiene grupos carboxilo formados previamente en la superficie en una solución de EDC y así se activan los grupos carboxilo de la superficie.

30 Cuando los grupos carboxilo de la superficie del soporte reaccionan con el grupo amino de una sustancia de unión selectiva utilizando dicho agente de condensación, la sustancia de unión selectiva se inmoviliza en la superficie del soporte mediante un enlace amida, mientras que cuando los grupos carboxilo de la superficie del soporte reaccionan con el grupo hidroxilo de una sustancia de unión selectiva, la sustancia de unión selectiva se inmoviliza en el soporte mediante un enlace éster. La temperatura de la reacción entre una muestra que contiene la sustancia de unión selectiva y un soporte es preferentemente de 5 °C a 95 °C, y más preferentemente de 15 °C a 65 °C. El periodo de procesamiento es generalmente de 5 minutos a 24 horas, y preferentemente de 1 hora o más. La Figura 1 es un gráfico que muestra el esquema para la inmovilización de una sustancia de unión selectiva. En la Figura 1, el 1 representa un sustrato PMMA; y el 2 representa una sustancia de unión selectiva (ADN).

Inmovilizando una sustancia de unión selectiva en una superficie de polímero mediante el método descrito anteriormente, es posible inmovilizar la sustancia de unión selectiva densa y rígidamente mediante enlaces covalentes que suprimen la adsorción no específica de una muestra (normalmente un ADN) debido a que los grupos carboxilo cargados negativamente presentes en la superficie excepto en las regiones puntuadas, y para obtener un soporte con eficacia de hibridación más alta con la muestra, presumiblemente debido a que la sustancia de unión selectiva inmovilizada tiene un grado de libertad espacial mayor que la inmovilizada en una superficie de cristal. El grado de libertad espacial más alto descrito anteriormente proporciona la ventaja de que es posible obtener una eficacia de hibridación extremadamente mejorada con una muestra en particular cuando la sustancia de unión selectiva que se utiliza es un también llamado oligo-ADN que tiene una longitud de 10 a 100 bases.

Utilizando un polímero que tiene la unidad estructural representada por la Fórmula general (1) para el soporte, es posible producir en gran cantidad un soporte que tenga una forma fina más fácilmente, por ejemplo, mediante moldeado por inyección o grabado en relieve en caliente que a partir de cristal, cerámica o metal. La forma del soporte sobre el que se inmoviliza la sustancia de unión selectiva se describirá posteriormente. El soporte que tiene inmovilizada una sustancia de unión selectiva de acuerdo con la presente invención tiene una parte con una depresión, y la sustancia de unión selectiva está inmovilizada en las superficies superiores planas de las proyecciones. Dicha estructura elimina la detección de muestras adsorbidas no específicamente, así como se describe posteriormente durante el análisis, y proporciona un soporte que tiene inmovilizada una sustancia de unión selectiva que tiene un menor ruido y en consecuencia es favorable en su relación S/N. En cuanto a la altura de las múltiples proyecciones de la parte con una depresión, las superficies de las proyecciones tienen preferentemente casi la misma altura. Una altura casi igual que se describe anteriormente significa una altura que no produce ninguna diferencia significativa de la intensidad de fluorescencia cuando se deja reaccionar un analito marcado fluorescentemente con una sustancia de unión selectiva inmovilizada en la superficie de las proyecciones ligeramente diferentes en altura y se hace un barrido de los analitos unidos en las respectivas superficies con un escáner. Concretamente, la altura casi igual significa una diferencia en altura de 100 μm o menos. Además, el soporte de acuerdo con la presente invención tiene un área plana. Un ejemplo típico se muestra en las Figuras 2 y 3. 11 representa el área plana, y la sustancia de unión selectiva (por ejemplo, un ácido nucleico) está inmovilizada sobre la superficie plana superior de las proyecciones representadas por 12 en la parte con una depresión. La superficie superior de las proyecciones de la parte con una depresión es sustancialmente plana. La expresión "sustancialmente plana" significa que la superficie superior de la proyección no tiene una irregularidad de 50 μm o más de altura. Además, la altura de las proyecciones en la parte con una depresión es casi la misma que el área plana. La frase "la altura del área plana es casi igual que la del área con una superficie irregular" significa que no hay un problema significativo de disminución del nivel de señal cuando se hace un barrido del soporte con un escáner. Concretamente, la altura casi igual significa la diferencia entre las alturas de la superficie superior de las proyecciones en la parte con una depresión y la del área plana es menor de 100 μm .

En general en las micromatrices, se permite que una muestra marcada fluorescentemente y una sustancia de unión selectiva inmovilizada sobre un soporte reaccionen entre ellas, y se lee la fluorescencia resultante con un dispositivo llamado escáner. El escáner desvía un rayo láser de excitación con una lente del objetivo y enfoca el rayo de láser. El rayo enfocado se irradia en la superficie de la micromatriz, y el punto focal del rayo láser se dirige a la superficie de la micromatriz. La fluorescencia generada sobre la micromatriz se lee entonces mediante el barrido de las lentes del objetivo o la propia micromatriz en las mismas condiciones.

Cuando se hace un barrido de un soporte que tiene inmovilizada una sustancia de unión selectiva sobre la superficie superior de la proyección de la presente invención mediante la utilización de un escáner, se demuestra que el efecto de la fluorescencia (ruido) de una muestra de ADN atraída no específicamente en el área con una depresión en la parte con una depresión es difícil de detectar. Esto es debido a que el rayo láser se enfoca sobre la superficie superior de la proyección en el área con una depresión. En otras palabras, entre las múltiples proyecciones sobre las que se inmoviliza la sustancia de unión selectiva, la diferencia de altura entre las superficies de la proyección más alta y más bajas preferentemente de 50 μm o menos. Debido a la fluctuación de las alturas de las superficies superiores de las proyecciones mayor de las diferencias anteriores puede impedir la fluctuación en la determinación precisa de la intensidad de fluorescencia debido a la profundidad focal del escáner.

La diferencia de altura entre las superficies de las proyecciones más altas y más bajas entre las múltiples proyecciones sobre las que está la sustancia de unión selectiva puede ser preferentemente de 50 μm o menos, más preferentemente 30 μm o menos, y aún más preferentemente, la altura de las proyecciones es la misma. La misma altura en la presente solicitud de patente incluye los errores debidos a las fluctuaciones que se pueden producir durante la producción o similares.

El área de proyecciones múltiples sobre las que se inmoviliza la sustancia de unión selectiva significa un área donde se inmoviliza una sustancia de unión selectiva esencial para la recolección de datos (por ejemplo, un ácido nucleico) y no incluye un área donde solamente se inmoviliza una sustancia de unión selectiva falsa.

En general, el método de ajuste el punto focal del escáner es de la siguiente manera: A saber, cuando se enfoca un rayo de excitación sobre la superficie de la micromatriz, el escáner ajusta el punto focal del rayo láser enfocando el rayo de excitación en las esquinas de la micromatriz o fijando la micromatriz en una plantilla como se muestra en la

Figura 4. El escáner barre la micromatriz completa en las mismas condiciones. (En la Figura 4, 13 representa una micromatriz; 14 una lente de objetivo; 15 una luz de excitación; y 16 un muelle para fijar una micromatriz a una plantilla). Por lo tanto, el soporte de acuerdo con la presente invención tiene preferentemente la parte con una depresión, así como un área plana. Un ejemplo típico del mismo se muestra en las Figuras 2 y 3. 11 representa un área plana, y una sustancia de unión selectiva (por ejemplo, un ácido nucleico) está inmovilizada sobre la superficie de las proyecciones en la parte con una depresión representadas por 12. Adicionalmente, la diferencia de altura entre la superficie de las proyecciones en la parte con una depresión y la del área plana es preferentemente de 50 μm o menos. De esta manera, cuando se hace un barrido de un soporte que tiene inmovilizada una sustancia de unión selectiva, se vuelve posible ajustar el punto focal del rayo de excitación una vez sobre la superficie del área plana o para fijar el área plana a la plantilla, haciendo más fácil posicionar el punto focal del escáner. Debido a que el rayo de excitación se enfoca de esta manera en el área plana, la superficie superior de las proyecciones en las que está inmovilizada la sustancia de unión selectiva es preferentemente plana y la diferencia de altura entre la superficie de las proyecciones y la superficie del área plana es de 50 μm o menos.

Una diferencia de altura entre la superficie de las proyecciones y la superficie del área plana de 50 μm o más puede producir los siguientes problemas. A saber, debido a que el punto focal del rayo de excitación se ajusta en la superficie superior del área plana, cuando la altura de la superficie superior de las proyecciones es diferente, el punto focal del rayo de excitación puede volverse borroso en la superficie superior de la proyección, resultando en el peor de los casos en la falta completa de detección de la fluorescencia generada por la reacción entre la sustancia de unión selectiva y la muestra. Un fenómeno similar se puede producir cuando no existe un área plana que sea tan alta como la superficie de las proyecciones.

De manera alternativa, cuando la superficie superior de las proyecciones no es plana el tamaño focal del rayo de excitación sobre la superficie superior de la proyección puede variar, dando lugar en consecuencia, a fluctuaciones en la intensidad de fluorescencia detectada incluso en una sola superficie superior de la proyección, que hace que los análisis posteriores sean más difíciles. En el caso de la presente solicitud, dichos problemas se evitan, y se puede obtener una señal favorable (fluorescencia).

La diferencia de altura entre la superficie de las proyecciones y la superficie del área plana es de 50 μm o menos, preferentemente 30 μm o menos, más preferentemente la misma que la del área plana. La misma altura en la presente solicitud de patente incluye los errores debidos a las fluctuaciones que se pueden producir durante la producción o similares.

En la presente invención, no se aplica puntualmente una sustancia de unión selectiva en un soporte plano, sino que la sustancia de unión selectiva se inmoviliza solo en la superficie de las proyecciones de la parte con una depresión. Por lo tanto, incluso cuando una muestra de analito es adsorbida no específicamente en un área distinta de la superficie superior de las proyecciones, no se detecta una fluorescencia de la muestra de analito indeseable adsorbida no específicamente, debido a que el punto focal del rayo de excitación está borroso en el área distinta de la superficie superior de las proyecciones, dando lugar a la reducción del ruido y con consecuencia una mejora de su relación S/N:

El uso de un método de moldeado por inyección es deseable por su productividad para la producción del soporte con dicha forma. Se necesitaría un molde para la producción del soporte de la forma mencionada anteriormente mediante el método de moldeado por inyección, y es preferible el uso de un procedimiento LIGA (Lithographie Galvanoformung Abformung) para la producción del molde debido a que da lugar a un molde a partir del cual el soporte moldeado se separa fácilmente.

Además, las áreas de las superficies superiores respectivas de las proyecciones son preferentemente casi iguales. De esta manera, se vuelve posible hacer uniformes las áreas sobre las que se inmovilizan diferentes sustancias de unión selectiva, lo que es ventajoso para los análisis posteriores. La frase "las áreas de las superficies superiores respectivas de las proyecciones son preferentemente casi iguales" significa que el mayor valor del área de superficie superior dividido por la menor área de superficie superior de todas las proyecciones es de 1,2 o menos.

El área de la superficie superior de la proyección no está limitada particularmente, pero es preferentemente de 4 mm^2 o menos y 100 mm^2 o más, desde el punto de vista de la reducción de la cantidad de sustancia de unión selectiva utilizada y el manejo más fácil.

La altura de las proyecciones en la parte con una depresión es preferentemente de 0,01 mm o más y 1 mm o menos. Una altura de la proyección de menos del valor anterior puede dar como resultado la detección de la muestra de analito adsorbida no específicamente en el área distinta de los puntos y en consecuencia un deterioro de la relación S/N. De manera alternativa, una altura de la proyección de 1 mm o más puede causar problemas tales como la vulnerabilidad a la rotura debido a la fractura de las proyecciones.

También es preferible que se forme un material conductor al menos en la superficie lateral de las proyecciones. De esta manera, se vuelve posible acelerar la hibridación, por ejemplo, de ácidos nucleicos, formando un contra electrodo y aplicando un voltaje entre el contra electrodo y el material conductor. El área preferible de las

proyecciones donde el material conductor está revestido es el área completa de las partes con una depresión o la superficie lateral completa de las proyecciones. La Figura 5 muestra un ejemplo (en la Figura 5, 21 representa la superficie de la proyección; 22 una película de conductividad; y 23 una película de aislamiento). Si fluye la corriente eléctrica, la tensión aplicada estará preferentemente en el intervalo de 0,01 V o más, y 2 V o menos, y particularmente preferentemente en el intervalo de 0,1 V o más y 1,5 V o menos. La aplicación de una tensión mayor que la anterior puede resultar en la electrólisis del agua y por tanto la generación de efectos adversos en la sustancia de unión selectiva de la superficie. El material para el material conductor no se limita particularmente, y un ejemplo del mismo incluye carbono, manganeso, aluminio, silicio, titanio, vanadio, cromo, manganeso, hierro, cobalto, níquel, cobre, estaño, zirconio, niobio, molibdeno, paladio, plata, hafnio, tantalio, tungsteno, platino, oro, acero inoxidable, o la mezcla de los mismos y polímeros conductores. Entre estos, se utilizan de manera particularmente preferente el platino, oro y titanio. Los métodos de producción de la película de estos materiales conductores incluyen el depósito por vapor, espurreado, CVD, chapado metálico, y similares.

Cuando un material conductor está revestido en el área de la proyección como se ha descrito anteriormente, la capa de aislamiento del material está formado adicionalmente de manera preferente en el área de las proyecciones distinta de la superficie superior. La presencia de la capa de aislamiento de material permite la atracción del analito en la superficie superior de la proyección cuando se aplica una corriente eléctrica. Ejemplos de los materiales de aislamiento incluyen óxidos metálicos (por ejemplo, A1-O, SiO₂, TiO₂, VO, SnO, Cr-O, Zn-O, GeO₂, Ta₂O₅, ZrO₂, Nb-O, Y₂O₃, etc.), nitruros (A1-N, Si₃N₄, TiN, Ta-N, Ge-N, Zr-N, NbN, etc.), sulfuros (por ejemplo, ZnS, PbS, SnS, y CuS), y polímeros de aislamiento.

El soporte que tiene inmovilizada una sustancia de unión selectiva así obtenida se puede tratar adicionalmente después de la inmovilización de la sustancia de unión selectiva. Es posible, por ejemplo, modificar la sustancia de unión selectiva inmovilizada mediante un tratamiento tal como el tratamiento por calor, el tratamiento con un álcali o el tratamiento con un tensioactivo.

En general, se permite que una muestra marcada fluorescentemente y una sustancia de unión selectiva inmovilizada sobre un soporte reaccionen entre ellas en una reacción de hibridación sobre el soporte que tiene inmovilizada una sustancia de unión selectiva, y se lee la fluorescencia resultante que se forma en el soporte con un dispositivo llamado escáner. El escáner desvía un rayo láser de excitación con una lente del objetivo y enfoca el rayo de láser. Sin embargo, cuando se produce una autofluorescencia en la superficie del soporte, la fluorescencia puede producir ruido y dar lugar al deterioro de la precisión de detección. Para evitar esto, es preferible ennegrecer la superficie añadiendo una sustancia negra que no emita luz por la irradiación con láser de la superficie del polímero que tiene la unidad estructural representada por la Fórmula general (1), ya que esto reduce la autofluorescencia del propio soporte. Utilizando dicho soporte, es posible proporcionar un soporte que tiene inmovilizada una sustancia de unión selectiva que tiene un ruido más bajo y con consecuencia una relación S/N durante la detección, debido a que se puede reducir la autofluorescencia del soporte.

El soporte ennegrecido significa un soporte en el que el área ennegrecida tiene una reflectancia espectroscópica uniformemente baja sin un patrón espectral particular (por ejemplo, sin ningún pico en particular) y una transmisibilidad espectroscópica uniformemente baja sin ningún patrón espectral en particular en el intervalo de luz visible (longitud de onda: 400 a 800 nm).

Con respecto a la reflectancia espectroscópica y transmisibilidad, la reflectancia espectroscópica está preferentemente en el intervalo del 7 % o menos en el intervalo de luz visible (longitud de onda: 400 a 800 nm) y la transmisibilidad espectroscópica es preferentemente del 2 % o menos en el mismo intervalo de longitud de onda. La reflectancia espectroscópica es una reflectancia espectroscópica que incluye la luz regular reflejada por el soporte, como se determina en un sistema iluminador-detector óptico compatible con la condición C de JIS Z 8722.

El soporte se puede ennegrecer añadiendo una sustancia negra al soporte y ejemplos favorables de las sustancias negras incluyen, negro de carbón, grafito, titanio negro, anilina negra, óxidos de metales tales como Ru, Mn, Ni, Cr, Fe, Co y Cu, carbidas de metales tales como Si, Ti, Ta, Zr y Cr, y similares.

Esta sustancia negra puede estar contenida sola o en combinación con dos o más de entre las sustancias negras; preferentemente están contenidos negro de carbón, grafito, titanio negro, y el negro de carbón se utiliza de manera particularmente preferente, debido a que se dispersa uniformemente en el polímero.

En cuanto a la forma del soporte, es preferible formar una capa que tenga inmovilizada una sustancia de unión selectiva de un polímero que tenga al menos una unidad estructural representada por la Fórmula general (1) en una capa del soporte de un material resistente a la deformación por calor tal como de cristal o metal, para evitar la alteración de la forma del soporte debido al calor o fuerzas externas. De manera alternativa, se puede utilizar una resina resistente a una temperatura relativamente alta tal como un policarbonato, poliimida, o poliamida como capa de soporte. La Figura 6 es un gráfico que ilustra dicha estructura. (2 representa una sustancia de unión selectiva (ADN), 3 representa una capa de soporte (cristal), y 4 representa una capa que tiene inmovilizada una sustancia de unión selectiva (PMMA)). Es preferible el cristal o metal tal como hierro, cromo, níquel, titanio o acero inoxidable como capa de soporte. Además, la superficie de la capa del soporte se termina preferentemente con un tratamiento

de plasma con argón, oxígeno o nitrógeno gaseosos o se trata con un agente de acoplamiento a silano, para mejorar la adhesión entre el soporte y la capa que tiene inmovilizada la sustancia de unión selectiva. Ejemplos de agentes de acoplamiento a silano incluyen el 3-aminopropil trietoxisilano, 3-aminopropil trimetoxisilano, 3-aminopropil dietoximetilsilano, 3-(2-aminoetilaminopropil) trimetoxisilano, 3-(2-aminoetilaminopropil) dimetoximetilsilano, 3-mercaptopropil trimetoxisilano, dimetoxi-3-mercaptopropilmetilsilano, y similares. Una capa que tiene inmovilizada una sustancia de unión selectiva se forma en la capa del soporte mediante uno de los medios conocidos, por ejemplo, por revestimiento por centrifugación o inmersión en una solución de un polímero disuelto en un disolvente orgánico. Más convenientemente, la capa que tiene inmovilizada una sustancia de unión selectiva puede adherirse al soporte mediante un adhesivo.

La "sustancia de unión selectiva" significa una sustancia que puede unirse selectivamente a una sustancia analito directa o indirectamente, y ejemplos típicos de las mismas incluyen los ácidos nucleicos, proteínas, sacáridos, y otros compuestos antigénicos. El ácido nucleico puede ser ADN, ARN o ANP. Los ácidos nucleicos de cadena sencilla que tengan una secuencia de bases particular que se hibride selectivamente y se una a un ácido nucleico de cadena sencilla que tenga una secuencia complementaria a la secuencia de bases o una parte de la misma, se incluyen en las "sustancias de unión selectiva" de acuerdo con la presente invención. Ejemplos de proteínas incluyen los anticuerpos, fragmentos de anticuerpo de unión al antígeno tales como fragmentos Fab y fragmentos F(ab')₂, y distintos antígenos. Los anticuerpos y sus fragmentos de unión al antígeno que se unen selectivamente a los antígenos complementarios respectivos y los antígenos que se unen selectivamente a los anticuerpos complementarios respectivos también se incluyen en las "sustancias de unión selectiva". En cuanto a los sacáridos son preferentemente polisacáridos, y ejemplos de los mismos incluyen distintos antígenos. De manera alternativa, se puede inmovilizar una sustancia antigénica distinta de una proteína o un sacárido. La sustancia de unión selectiva para su uso en la presente invención puede ser un producto disponible en el mercado o una sustancia preparada a partir de una célula viva o similar. Como "sustancias de unión selectiva" particularmente preferibles están los ácidos nucleicos. Entre los ácidos nucleicos son preferibles los llamados ácidos oligonucleicos, ácidos nucleicos que tienen una longitud de 10 a 100 bases, debido a que es posible prepararlos fácilmente en un sintetizador, unir el grupo amino al extremo del ácido nucleico y así inmovilizarlo en la superficie del soporte. Además, la longitud del ácido oligonucleico es preferentemente de 20 a 100 bases, desde el punto de vista de la eficacia de hibridación, esta es menor con un ácido oligonucleico que tenga menos de 20 bases, y particularmente de manera preferente en el intervalo de 40 a 100 bases, para asegurar la estabilidad de la eficacia de hibridación.

Ejemplos de las sustancias analito que se van a procesar en el método de medición utilizando el soporte de acuerdo con la presente invención incluyen, pero no se limitan a, ácidos nucleicos que se van a evaluar, tal como genes de bacterias y virus patógenos y genes causantes de enfermedades genéticas, o la región parcial de los mismos, distintos componentes biológicos antigénicos; anticuerpos contra bacterias y virus patógenos; y similares. Ejemplos de las muestras que contienen las sustancias analitos anteriores incluyen, pero no se limitan a, fluidos corporales tales como sangre, suero, plasma, orina, heces, fluido cefalorraquídeo, saliva, y distintos fluidos de tejidos y distintos alimentos y bebidas o diluyentes de los mismos, y similares. El ácido nucleico analito se puede preparar marcando un ácido nucleico extraído de la sangre o las células de acuerdo con un método común o por amplificación mediante un método de amplificación de ácidos nucleicos tal como la PCR utilizando el ácido nucleico como matriz. En el último caso, es posible aumentar la sensibilidad de la medición drásticamente. Cuando se utiliza un producto amplificado de ácido nucleico como sustancia analito, es posible marcar el ácido nucleico amplificado llevando a cabo la amplificación en presencia de un nucleótido 3-fosfato marcado con un material fluorescente o similar. Cuando la sustancia analito es un antígeno o un anticuerpo, la sustancia analito, antígeno o anticuerpo, puede marcarse directamente mediante un método común, o alternativamente, la sustancia analito, antígeno o anticuerpo, se puede unir primero a una sustancia de unión selectiva; después de lavar el soporte, se deja reaccionar el antígeno o anticuerpo con un anticuerpo o antígeno marcado que reacciona en la reacción antígeno anticuerpo, y luego, se analizan los marcadores unidos al soporte.

La etapa para la interacción entre la sustancia inmovilizada y una sustancia analito puede ser la misma que se practica tradicionalmente. La temperatura de reacción y el periodo se pueden seleccionar arbitrariamente, por ejemplo, de acuerdo con la longitud de la cadena del ácido nucleico que se va a hibridar y los tipos de antígeno y/o anticuerpo implicados en la reacción inmunitaria, pero la reacción se lleva a cabo a aproximadamente 50 °C a 70 °C, durante aproximadamente 1 minuto hasta más de diez horas en el caso de la hibridación de un ácido nucleico y generalmente, a temperatura ambiente hasta aproximadamente 40 °C durante aproximadamente 1 minuto hasta varias horas en el caso de una reacción inmunitaria.

Ejemplos

La presente invención se describirá con mayor detalle en referencia a los siguientes Ejemplos, pero se debería entender que la presente invención no está restringida por los siguientes Ejemplos.

Ejemplo de referencia 1 (no de acuerdo con la invención)

Se lavó completamente una placa transparente de polimetilmetacrilato (PMMA) (placa extruida Comoglass, fabricada por Kuraray Co., Ltd., grosor: 1 mm, peso molecular medio: 150.000, es decir, grado de polimerización promedio:

1.500) con etanol y agua purificada y se sumergió en una solución acuosa de hidróxido sódico 10 N a 70 °C durante 12 horas. Después, la placa se lavó con agua purificada, una solución acuosa de HCl 0,1 N, y agua purificada en ese orden. Utilizando la placa tratada con un álcali y una placa no tratada con álcali como muestras, se marcaron los grupos carboxilo de la superficie de las muestras con un reactivo de marcado que contenía fluorina (trifluoroetanol) en fase gaseosa. Después, las muestras se analizaron por XPS en condiciones de un diámetro de rayos X de 1 mm y un ángulo de escape de fotoelectrones de 90° utilizando rayos Al K α 1 y 2 (1486,6 eV) monocromáticos, y se determinaron los grupos carboxilo a partir de las intensidades del área del pico de Cls y F1s, tomando en consideración la velocidad de reacción. Los resultados revelaron que el contenido en grupos carboxilo de la muestra no tratada con un álcali era 0,0013 (relación de carbono con grupos carboxilo con respecto al carbono total), mientras que el de la muestra tratada con el álcali era de 0,0015, mostrando un aumento del contenido de grupos carboxilo en la superficie.

Además, el análisis por TOF-SIMS (espectrometría de masas de ion secundario con tiempo de vuelo) sobre la cantidad y distribución de fluorina sobre la superficie de las dos muestras en las que los grupos carboxilo se marcaron con trifluoroetanol dio los siguientes resultados. Cuando se compararon las dos muestras, la muestra tratada con hidróxido sódico presentaba picos más fuertes de $^{19}\text{F}^-$ y $^{69}\text{CF}_3$ que la muestra sin tratar, indicando que la muestra tratada con hidróxido sódico contenía más grupos carboxilo que la muestra sin tratar. Específicamente, un recuento iónico del pico que tiene un número de masa de 19 correspondiente a F- de la muestra sin tratar era de 8.000, mientras que el recuento iónico de la muestra tratada con hidróxido sódico era de 25.000. Además, el recuento iónico del pico que tiene un número de masa de 69 correspondiente a CF_3 de la muestra sin tratar era de 1.200, pero el de la muestra tratada con hidróxido sódico era de 7.000. Además, el análisis TOF-SIMS de dos dimensiones sobre la distribución de fluorina en la superficie de las muestras revelaba que la muestra tratada con hidróxido sódico tenía una imagen iónica de $^{19}\text{F}^-$ localizada (presencia de áreas circulares de 30 a 40 μm y mechas de 30 a 40 μm de anchura menores en fuerza iónica). Los resultados indican que la muestra tratada con un álcali tiene una distribución en cuya superficie se localizan los grupos carboxílicos. Por otra parte, la muestra sin tratar no presentaba la distribución en la se localice particularmente la imagen iónica de $^{19}\text{F}^-$. De manera alternativa, ambas muestras no presentaban una distribución particularmente localizada en la imagen iónica de $^{31}\text{CH}_3\text{O}^-$ presumiblemente correspondiente a un grupo metoxi.

30 Ejemplo 1 (no de acuerdo con la invención)

(Preparación de un soporte con ADN inmovilizado)

Una placa transparente de polimetilmetacrilato (PMMA) (placa extruida Comoglass, fabricada por Kuraray Co., Ltd., grosor: 1 mm, peso molecular medio: 150.000, es decir, grado de polimerización promedio: 1.500) se sumergió en una solución acuosa de hidróxido sódico 10 N a 65 °C durante 12 horas. Después, la placa se lavó completamente con agua purificada, una solución acuosa de HCl 0,1 N, y agua purificada en ese orden. De esta manera, se formaron grupos carboxilo en la superficie de la placa mediante hidrólisis de las cadenas laterales de PMMA. La intensidad de la autofluorescencia de la placa (no tratada con un álcali) era de 650 según se determinó en condiciones de una longitud de onda de excitación de 532 nm, una ganancia de fotomultiplicador fijada en 700 y una potencia de láser del 33 % utilizando GenePix 4000B fabricado por Axon Instruments.

(inmovilización de una sonda de ADN)

Se prepararon los ADN que tenían la secuencia N.º 1 (70 bases, extremo 5' aminado), secuencia N.º 2 (60 bases, extremo 5' aminado), secuencia N.º 3 (40 bases, extremo 5' aminado), y secuencia N.º 4 (20 bases, extremo 5' aminado). Los extremos 5' de los ADN que tenían las secuencias N.º 1 a 4 se aminaron.

Estos ADN se disolvieron en agua purificada hasta una concentración de 0,27 nmol/ μl , para dar las soluciones de reserva respectivas. Para la aplicación puntual sobre el sustrato, se preparó una solución de cada sonda diluida con PBS (una solución de 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 disueltos en agua purificada hasta un volumen total de 1 l y con ácido clorhídrico para el ajuste del pH, a un pH de: 5,5) hasta una concentración final de 0,027 nmol/ μl , que contenía adicionalmente 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) a una concentración final de 50 mg/ml para la condensación de los grupos carboxilo sobre la superficie del soporte con el grupo amino terminal de la sonda de ADN. Después, cada una de estas soluciones de mezclas se aplicó puntualmente sobre el sustrato en una cantidad de aproximadamente 200 nl. Es decir, los cuatro tipos de sonda se aplicaron puntualmente en un punto respectivamente del sustrato de PMMA. Después, el sustrato se colocó en un envase de plástico sellado fuertemente, y se incubó en condiciones de 37 °C y una humedad del 100 % durante aproximadamente 20 horas, y luego se lavó con agua purificada. La Figura 1 muestra el esquema de la reacción.

(Preparación de la muestra de ADN)

Se utilizó la secuencia de ADN N.º 8 (968 bases) con una secuencia de bases que se podía hibridar con el ADN inmovilizado en el sustrato como una muestra de ADN.

El método de preparación es el siguiente:

Se prepararon los ADN de secuencias N.º 5 y 6. Estos ADN se disolvieron respectivamente en agua purificada hasta una concentración de 100 µM. Después, se adquirió el ADN plasmídico pKF3 (Takara Bio Inc. Número de producto: 3.100, secuencia N.º 7, 2.264 bases), y se amplificó utilizándolo como matriz y los ADN de secuencia N.º 5 y 6 como cebadores en una reacción de PCR (Reacción en cadena de la Polimerasa).

5 Las condiciones de la PCR eran las siguientes: se mezclaron EXTaq (2 µl), 10xExBuffer (40 µl) y Mezcla de dNTP (32 µl) (estos reactivos se unieron al producto número RRO01A fabricado por Takara Bio Inc.), una solución de secuencia N.º 5 (2 µl), una solución de secuencia N.º 6 (2 µl), y una solución de matriz (secuencia N.º 7) (0,2 µl) y se diluyeron con agua purificada hasta un volumen total de 400 µl. La mezcla líquida se dividió en cuatro microtubos, y se llevó a cabo la reacción de PCR utilizando un ciclador térmico. El producto se purificó mediante precipitación en etanol y se disolvió en 40 µl de agua purificada. El análisis electroforético de parte de la solución después de la reacción de PCR confirmó que la longitud de bases del ADN amplificado era aproximadamente de 960 bases y se amplificó el ADN de secuencia N.º 8 (968 bases).

15 Después, se disolvió un cebador aleatorio que tenía 9 bases (fabricado por Takara Bio Inc., producto número 3802) hasta una concentración de 6 mg/ml y 2 µl de solución se añadieron a la solución de ADN purificado mencionada anteriormente después de la reacción de PCR. La solución se calentó a 100 °C y se inactivó en hielo. Se añadieron a esta 5 µl de tampón unida al Fragmento Klenow (fabricado por Takara Bio Inc. producto número 2140AK) y 2,5 µl de una mezcla de dNTP (que contenía dATP, dTTP, y dGTP cada uno a una concentración de 400 mM).
20 Adicionalmente, se añadieron 2 µl de Cy3-dCTP (fabricado por Amersham Pharmacia Biotech, producto número PA53021). Después de la adición de 10 U del fragmento Klenow a la solución, la mezcla se incubó a 37 °C durante 20 horas, para dar una muestra de ADN marcado con Cy3. El uso del cebador aleatorio durante el marcado daba como resultado una fluctuación en la longitud de la muestra de ADN. La muestra de ADN más larga es el ADN de la secuencia N.º 8 (968 bases). El análisis electroforético de parte de la solución de muestra de ADN presentaba la
25 banda más intensa en el área correspondiente aproximadamente a 960 bases y bandas ligeramente manchadas en el área correspondiente a las longitudes de bases más cortas. El producto se purificó entonces mediante precipitación en etanol y se secó.

30 La muestra de ADN marcada se disolvió en 400 µl de una solución que contenía un 1 % (p/v) de BSA (seroalbúmina bovina), 5 x SSC (5 x SSC: 43,8 g de NaCl y 22,1 g de citrato trisódico hidrato disueltos en agua purificada hasta un volumen total de 1 l; 43,8 g de NaCl y 22,1 g de citrato trisódico hidrato disueltos en agua purificada hasta un volumen total de 5 l se denominó 1 x SSC, y la solución concentrada 10x, 10 x SSC, la solución diluida 5x, 0,2 x SSC), un 0,1 % (p/v) de SDS (dodecilsulfato sódico) y un 0,01 % (p/v) de ADN de esperma de salmón (cada concentración: concentración final) y se utilizaron como solución para la hibridación.

(Hibridación)

La sonda de ADN obtenida de esta manera se aplicó sobre el sustrato inmovilizado para la hibridación de la muestra de ADN. Específicamente, se aplicaron gota a gota 10 µl de la solución para la hibridación en el soporte que tenía
40 inmovilizada la sonda de ácido nucleico preparado anteriormente y el soporte se cubrió con un cubreobjetos. Además, el cubreobjetos de cristal se selló con papel adhesivo para evitar la evaporación de la solución de hibridación. El soporte se colocó en un envase de plástico y se incubó en condiciones de 65 °C y una humedad del 100 % durante aproximadamente 10 horas. Después de la incubación, el cubreobjetos de cristal se retiró y se lavó y
45 secó el soporte.

(Medición)

Después de la hibridación se observó la fluorescencia de la superficie del sustrato bajo un microscopio de fluorescencia (Olympus Optics) para la evaluación de la presencia de la hibridación. Se observó la emisión
50 fluorescente indicando la hibridación en la región completa de la sonda. La diferencia de intensidad entre las fluorescencias del punto y el fondo expandido, como número base aumentaba de 40 a 60 y 70, es decir, la mejora de la relación S/N respecto al número base de la sonda aumentaba.

Para una exposición más cuantitativa, el soporte después del tratamiento se fijó entonces en un escáner para chips de ADN (GenePix 4000B, fabricado por Axon Instruments), y se determinó la fluorescencia de esta manera en
55 condiciones de salida de láser del 33 % y ganancia de fotomultiplicador de 500. Los resultados se resumen en la Tabla 1. En la Tabla, la intensidad de fluorescencia es la media de intensidad de fluorescencia en el punto, y el ruido es la media de intensidad de fluorescencia en el área que rodea el punto (área donde no se aplicó puntualmente ningún ADN).

Ejemplo comparativo 1

Se llevaron a cabo ensayos en los que el sustrato de PMMA del Ejemplo 1 se sustituyó con un sustrato de cristal.

65 Se sumergió un portaobjetos de cristal en una solución acuosa de NaOH 10 N durante 1 hora y se lavó completamente con agua purificada. Después, se disolvió APS (3-aminopropiltriethoxisilano, fabricado por Shin-Etsu

Chemical Co., Ltd.) en agua purificada con una relación del 2 % (p/v), y el portaobjetos de cristal mencionado anteriormente se sumergió en este durante 1 hora, después se retiró de la solución y secó a 110 °C durante 10 minutos. De esta manera, se introducen grupos amino en la superficie de cristal.

- 5 Después, se disolvieron 5,5 g de anhídrido succínico en 335 ml de 1-metil-2-pirrolidona. se añadieron 50 ml de una solución de borato sódico 1 M /que contenía 3,09 g de ácido bórico e hidróxido sódico para el ajuste del pH en agua purificada hasta un volumen total de 50 ml, pH: 8,0) a la solución de ácido succínico. La placa de cristal anterior se sumergió en la mezcla líquida durante 20 minutos. Después de la inmersión, la placa de cristal se lavó con agua purificada y se secó. De esta manera, se permitió que los grupos amino de la superficie de la placa de cristal y el
- 10 anhídrido succínico reaccionaran entre ellos, introduciendo grupos carboxilo sobre la superficie de cristal. La placa de cristal resultante se utilizó como sustrato para la inmovilización de un ADN. Además, se inmovilizaron ADN que tenían secuencias de bases de 1 a 4 respectivamente sobre la placa de cristal de una manera similar al Ejemplo 1. La Figura 7 muestra el esquema de la reacción (en la Figura 7, 2 representa una sustancia de unión selectiva (ADN), y 5 una placa de cristal). La placa de cristal se hibrida entonces de manera similar al Ejemplo 1. La placa se examinó
- 15 de manera similar al Ejemplo 1 bajo un microscopio de fluorescencia.

- Al observarse bajo el microscopio de fluorescencia, era observable la luz de emisión también en la placa de cristal solo cuando la región de la sonda tenía 40 bases o más. Sin embargo, la intensidad de fluorescencia de las tres placas de los Ejemplos comparativos demostró ser distintivamente menores que cuando el sustrato era PMMA. Para
- 20 una exposición más cuantitativa, la intensidad de la luz de estos sustratos se determinó utilizando un escáner. Los resultados del mismo y del Ejemplo 1 se resumen en la Tabla 1. Los resultados de la Tabla 1 indica que la fluorescencia es menor, el ruido mayor, y la relación S/N es inferior en la placa de cristal.

- Por otra parte, se inmovilizó un ADN y se hibridó con el mismo esquema anterior utilizando otro portaobjetos de cristal disponible en el mercado que tenía grupos amino. Los portaobjetos de cristal que se utilizaron eran
- 25 portaobjetos de cristal revestidos que tenían grupos amino de alta densidad para la micromatriz de ADN (fabricados por Matsunami Glass Inc., Ltd., número de producto SD00011) y portaobjetos de cristal revestidos de MAS (fabricados por Matsunami Glass Inc., Ltd., número de producto S081110). El análisis de manera similar al anterior mostraba que la relación S/N era inferior incluso cuando estos portaobjetos de cristal se comparaban con el uso de
- 30 una placa de PMMA como sustrato. Los resultados se resumen en la Tabla 1

Tabla 1

		Longitud de bases de la sonda							
		70 Bases		60 Bases		40 Bases		20 Bases	
Tipo de sustrato		Intensidad de fluorescencia	Ruido	Intensidad de fluorescencia	Ruido	Intensidad de fluorescencia	Ruido	Intensidad de fluorescencia	Ruido
Ejemplo	PMMA	23000	150	18400	155	12400	150	2500	145
Ejemplo comparativo 1	Cristal APS	3000	1600	1800	1540	1200	1620	1680	1330
	Cristal MAS	7500	2000	6700	2100	2000	1890	1530	1680
	Cristal que tiene grupos amino de alta densidad	8500	2300	7200	2000	3500	1800	1850	1500

Ejemplo comparativo 2

(preparación del portaobjetos de cristal)

- 5 Se introdujeron grupos amino en la superficie de un portaobjetos de cristal utilizando 3-aminopropiltriethoxisilano de manera similar al Ejemplo comparativo 1. Después, se introdujeron los grupos carboxilo sobre la superficie del portaobjetos de cristal de manera similar al Ejemplo comparativo 1 utilizando anhídrido succínico, y luego se lavó el portaobjetos de cristal con acetonitrilo y se secó a presión reducida durante 1 hora. después del secado, la placa de cristal carboxilada terminada se sumergió en una solución de EDC (955 mg) y N-hidroxisuccinimida (565 mg) en acetonitrilo (50 ml) durante 2 horas, se lavó con acetonitrilo y se secó durante una hora bajo presión reducida, para dar una placa de cristal que tenía grupos de N-hidroxisuccinimida unidos a la superficie mediante enlaces éster.
- 10

(Inmovilización de ADN)

- 15 Utilizando un ADN aminado en el extremo 5' de manera similar al Ejemplo 1, se aplicaron puntualmente 200 nl de una dispersión acuosa de ADN en 0,1 M de solución de tampón de carbonato (pH: 9,3, concentración de ADN: 0,027 nmol/ μ l) sobre la placa de cristal obtenida de esta manera. Inmediatamente después, la placa de cristal tras la inmovilización se dejó a 25 °C y una humedad del 90 % y se lavó la placa de cristal dos veces con una mezcla en solución de un 0,1 % (p/v) de SDS y 2 x SSC y una vez con una solución acuosa de 0,2 x SSC sucesivamente.
- 20 Después, la placa de cristal tras el lavado se sumergió en una solución acuosa de glicina 0,1 M (pH: 10) durante 1 hora y 30 minutos, se lavó con agua destilada, y se secó a temperatura ambiente, para dar una placa de cristal que tenía el fragmento de ADN inmovilizado.

(Detección)

- 25 La placa de cristal se hibridó utilizando la misma muestra de ADN de manera similar al ensayo de hibridación del Ejemplo 1. Los resultados se resumen en la Tabla 2 Como es evidente por los resultados, el sustrato del Ejemplo 1 tiene una relación S/N no satisfactoria, en comparación con el sustrato de PMMA.

30

Tabla 2

		Longitud de bases de la sonda							
		70 Bases		60 Bases		40 Bases		20 Bases	
		Intensidad de fluorescencia	Ruido	Intensidad de fluorescencia	Ruido	Intensidad de fluorescencia	Ruido	Intensidad de fluorescencia	Ruido
Ejemplo comparativo 2		4300	2000	3000	1500	1800	1220	1500	1200

Ejemplo 2 (no de acuerdo con la invención)**(Preparación de un soporte con ADN inmovilizado)**

- 5 Se mezcló negro de carbón con un PMMA que tenía un peso molecular medio de 150.000 con una relación de un 3 % pp, y la mezcla se procesó en un sustrato negro que tenía un grosor de 1 mm mediante el método de fundición. El sustrato de PMMA negro se sumergió en una solución acuosa de hidróxido sódico 10 N a 65 °C durante 12 horas. El sustrato se lavó con agua purificada, una solución acuosa de HCl 0,1 N, y agua purificada en ese orden. La intensidad de la autofluorescencia de la placa (sin el tratamiento con un álcali) era de 250 según se determinó en
- 10 condiciones de una longitud de onda de excitación de 532 nm, una ganancia de fotomultiplicador fijada en 700 y una potencia de láser del 33 % utilizando GenePix 4000B fabricado por Axon Instruments. Se preparó un soporte ennegrecido con el ADN inmovilizado con un procedimiento similar utilizando cuatro tipos de sondas de ADN de manera similar a las utilizadas en el Ejemplo 1.
- 15 Por separado, se preparó un sustrato similar y se determinaron la reflectancia espectroscópica y la transmisibilidad del sustrato negro, y como resultado, el sustrato tenía una reflectancia espectroscópica del 5 % o menos a una longitud de onda en el intervalo completo de luz visible (longitudes de onda de: 400 a 800 nm) y una transmisibilidad del 0,5 % o menos a una longitud de onda en el mismo intervalo. El sustrato tenía un espectro uniformemente plano sin un patrón espectral particular (por ejemplo, con picos) tanto en la reflectancia espectroscópica como en la
- 20 transmisibilidad en el intervalo de luz visible. La reflectancia espectroscópica es una reflectancia espectroscópica que incluye la reflectancia regular del soporte, como se determina en un dispositivo equipado con un sistema iluminador-detector óptico (CM-2002 fabricado por Minolta Camera) compatible con la condición C de JIS Z 8722.

(Preparación e hibridación de la muestra de ADN)

- 25 Se preparó una muestra de ADN y se hibridó de manera similar al Ejemplo 1.

(Medición)

- 30 Se midió la fluorescencia con un escáner en las mismas condiciones que en el Ejemplo 1. Los resultados de la observación del escáner se resumen en la Tabla 3. De manera similar al Ejemplo 1, la intensidad de fluorescencia aumentaba según aumentaba el número de bases. La intensidad de la fluorescencia de fondo también disminuía, en comparación con el resultado del Ejemplo 1. Los resultados confirmaban que el ennegrecimiento del sustrato daba lugar a un descenso del ruido y un aumento de la relación S/N.

Tabla 3

		Longitud de bases de la sonda							
Ejemplo 2	Tipo de sustrato	70 Bases		60 Bases		40 Bases		20 Bases	
		Intensidad de fluorescencia	Ruido	Intensidad de fluorescencia	Ruido	Intensidad de fluorescencia	Ruido	Intensidad de fluorescencia	Ruido
	PMMA negro	25000	50	21000	45	11800	66	1500	52

Ejemplo (no de acuerdo con la invención)

Se preparó un portaobjetos de cristal que tenía introducido 3-aminopropiltriethoxisilano en su superficie de manera similar al Ejemplo comparativo 1. Se revistió mediante centrifugación con PMMA disuelto en cloroformo, y se dejó el cristal a 100 °C durante 15 minutos y adicionalmente a 115 °C durante 1 hora, para dar un soporte que consistía en una capa de soporte (de cristal) y una capa que tenía inmovilizada la sustancia de unión selectiva (PMMA). El grosor del PMMA de revestimiento mediante centrifugación era de aproximadamente 20 µm.

Después, se sumergió el soporte en NaOH 10 N durante 10 horas, formándose los grupos carboxilo en la superficie del PMMA. Se inmovilizó una sonda de ADN, se preparó una muestra de ADN y se hibridaron, y se determinó la intensidad de fluorescencia de manera similar al Ejemplo 1. Se obtuvieron resultados similares a los del Ejemplo 1. Aunque el sustrato estaba ligeramente inclinado no había una deformación observable en el soporte de este Ejemplo.

Además, cuando el PMMA que contenía negro de carbón dispersado que se utilizó en el Ejemplo 2 lo revestía por centrifugación de manera similar, se obtuvo una intensidad de fluorescencia y ruido similares a los del Ejemplo 2, y no había deformación observable en el soporte tampoco en este caso.

Ejemplo 4 (no de acuerdo con la invención)

Se llevó a cabo un ensayo de manera similar al Ejemplo 1, excepto que se utilizó ácido sulfúrico 10 N en vez de una solución acuosa de NaOH 10 N durante la introducción de los grupos carboxilo sobre la superficie de PMMA. En consecuencia, se obtuvieron resultados similares a los del Ejemplo 1.

Ejemplo 5 (no de acuerdo con la invención)

Se preparó un copolímero de estireno y MMA (metil metacrilato). El copolímero preparado tenía una composición de un 10 % molar de MMA y un 90 % molar de estireno. Específicamente, el copolímero se preparó disolviendo el MMA y el estireno con una relación de 1:9 (relación molar) en tolueno deshidratado, se añadió AIBN (azobisisobutilnitrilo) con una relación de 1/1000 con respecto al número total de moles de MMA y estireno, y se dejó la mezcla en una atmósfera de nitrógeno a 60 °C durante 1 hora, a 65 °C durante 3 horas, y adicionalmente a 90 °C durante 20 horas. El copolímero obtenido de esta manera se purificó mediante precipitación en etanol y filtración.

La composición del polímero purificado se examinó mediante NMR (resonancia magnética nuclear). El peso molecular del polímero se determinó mediante GPC y el grado de polimerización promedio calculado del mismo era de 1.100.

Después, se procesó el polímero purificado en una placa que tenía 1 mm de grosor por el método de fundición. Se llevaron a cabo ensayos similares a los del Ejemplo 1, excepto que se utilizó la secuencia de ADN N.º 2 para la inmovilización. Se determinó la fluorescencia con un escáner en condiciones similares a las del Ejemplo 1. El resultado revelaba que la intensidad de fluorescencia era de 5.200, el ruido de 150, y el contenido de MMA del 10 % y que la relación S/N había mejorado en comparación con la de los Ejemplos comparativos 1 y 2. La intensidad de autofluorescencia de una placa plana no tratada con un álcali era de 750 según se determinó utilizando GenePix 4000B fabricado por Axon Instruments en condiciones de una longitud de onda de excitación de 532 nm, una ganancia de fotomultiplicador fijada en 700 y una potencia de láser del 33 %.

Ejemplo comparativo 3

Se preparó un homopolímero y se procesó en una placa que tenía un grosor aproximado de 1 mm por el método de fundición. En los ensayos similares a los del Ejemplo 1 utilizando la placa, no se observaba para nada una fluorescencia que indicara hibridación entre la sonda de ADN y la muestra de ADN.

Ejemplo 6**(Preparación de un soporte con ADN inmovilizado)**

Se preparó un molde para moldeado por inyección de acuerdo con un proceso LIGA conocido (Lithographie Galvanoformung Abformung), y se preparó un sustrato de PMMA que tenía la forma descrita posteriormente mediante moldeado por inyección. El PMMA utilizado en este Ejemplos tenía un peso molecular medio de 150.000 y contenía negro de carbón (nº 3050B, fabricado por Mitsubishi Chemical Corp.) con una relación de un 1 % pp, y el sustrato tenía una apariencia negra. Cuando se determinó la reflectancia espectroscópica y la transmisibilidad del sustrato negro, la reflectancia espectroscópica era del 5 % o menos a una longitud de onda en el intervalo de luz visible (longitudes de onda de: 400 a 800 nm) y la transmisibilidad del 0,5 % o menos a una longitud de onda en el mismo intervalo. Los espectros de la reflectancia espectroscópica y la transmisibilidad eran uniformemente planos, sin patrones espectrales particulares (por ejemplo, con picos). La reflectancia espectroscópica es una reflectancia espectroscópica que incluye la reflexión regular del soporte, como se determina utilizando un dispositivo equipado

con un sistema iluminador-detector óptico (fabricado por Minolta Camera, CM-2002) compatible con la condición C de JIS Z 8722.

5 La forma del sustrato era de 76 mm de longitud, 26 mm de anchura, y 1 mm de grosor, y la superficie era plana excepto en el área central del sustrato. Se formó una parte con una depresión de 10 mm de diámetro y 0,2 mm de profundidad en el centro del sustrato, y se formaron 64 (8 x 8) proyecciones que tenían un diámetro de su superficie superior de 0,2 mm y una altura de 0,2 mm en la parte con una depresión. Las proyecciones, que tenían un diámetro de base (diámetro de la región de base de la proyección) de 0,23 mm se taparon por conveniencia para la liberación del sustrato después del moldeado por inyección. La diferencia entre la altura de la superficie superior de la proyección (como media de la altura de las 64 proyecciones) en la parte con una depresión y la altura del área plana era de 3 μ m o menos, según se determinó. Además, la variación de altura de las superficies superiores de las 64 proyecciones (diferencia de altura entre la superficie superior más alta y más baja de las proyecciones), y la diferencia entre la altura de la superficie superior de las proyecciones en el área con una superficie irregular y la altura del área plana, según se determinó, eran de 3 μ m o menos. Adicionalmente, la distancia de las proyecciones en el área con una superficie irregular (distancia entre el centro de una proyección al centro de otra proyección próxima) era de 0,6 mm.

20 El sustrato de PMMA se sumergió en una solución acuosa de hidróxido sódico 10 N a 65 °C durante 12 horas. El sustrato se lavó con agua purificada, una solución acuosa de HCl 0,1 N, y agua purificada en ese orden, para dar un sustrato que tenía grupos carboxilos formados en su superficie. La intensidad de la autofluorescencia de la placa, es decir, la placa plana de PMMA que contenía negro de carbón utilizada en este Ejemplo era de 250, según se determinó en condiciones de una longitud de onda de excitación de 532 nm, una ganancia de fotomultiplicador fijada en 700 y una potencia de láser del 33 % utilizando GenePix 4000B fabricado por Axon Instruments.

25 (inmovilización de una sonda de ADN)

30 Se preparó la secuencia de ADN N.º 2 (60 bases, extremo 5' aminado). El ADN se aminó en el extremo 5'. El ADN se disolvió en agua purificada a una concentración de 0,27 nmol/ μ l, el cual se utilizó como una solución de reserva. Para la aplicación puntual del sustrato, se diluyó la solución de reserva con PBS, pH: 5,5 hasta una concentración final de la sonda de 0,027 nmol/ μ l, y se añadió a esta 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) hasta una concentración final de 50 mg/ml para facilitar la condensación entre los grupos carboxilo sobre la superficie del soporte y el grupo amino terminal de la sonda de ADN. La solución de la mezcla, es decir, la sonda de ADN era la aplicada puntualmente en cuatro puntos sobre las proyecciones del sustrato de PMMA con un capilar de cristal bajo el microscopio. Después, el sustrato se colocó en un envase de plástico sellado fuertemente, y se incubó en condiciones de 37 °C y una humedad del 100 % durante aproximadamente 20 horas, y luego, se lavó con agua purificada.

(Preparación de la muestra de ADN)

40 Se preparó la muestra de ADN de manera similar al Ejemplo 1.

(Hibridación)

45 A 10 μ l de la solución de ADN descrita anteriormente (preparación de la muestra de ADN), se añadieron 30 μ l de una solución que contenía un 1 % (p/v) de BSA, 5 x SSC, un 0,1 % (p/v) de SDS, y un 0,01 % (p/v) de ADN de esperma de salmón, para hacer la solución total de 40 μ l (es decir, la concentración de la muestra era de 1/4 en comparación la de los Ejemplos 1 o 2, pero la cantidad total de muestra era la misma que la del Ejemplo 1). La solución se aplicó gota a gota en el área con una superficie irregular del soporte con ADN inmovilizado descrito anteriormente, y se cubrió el sustrato cuidadosamente con un cubreobjetos de cristal. Además, el área circundante del cubreobjetos de cristal se selló con papel adhesivo para evitar la evaporación de la solución de hibridación. A saber, el peso molecular de la muestra de ADN se hizo igual que la del Ejemplo 1, El sustrato se colocó en un envase de plástico y se incubó en condiciones de humedad del 100 % y una temperatura de 65 °C durante 10 horas. Después de la incubación, el cubreobjetos de cristal se retiró, y el sustrato se lavó y secó.

55 (Medición)

Se analizó la fluorescencia del mismo de manera similar al Ejemplo 1 con un escáner. Los resultados se resumen en la Tabla 4

Tabla 4

	Tipo de sustrato	Punto 1		Punto 2		Punto 3		Punto 4	
		Intensidad de fluorescencia	Ruido						
Ejemplo 6	Sustrato PMMA negro que tiene una parte de depresión que incluye múltiples proyecciones	21500	27	20500	26	20200	28	20800	22

Como es evidente por los resultados, la intensidad de fluorescencia era casi la misma que la del Ejemplo 2, pero el ruido se reducía adicionalmente respecto al del Ejemplo 2.

Ejemplo 7

5 Posteriormente, se llevó a cabo un ensayo utilizando un sustrato que tenía proyecciones irregulares en cuanto a la altura. Las proyecciones en el sustrato de PMMA moldeado por inyección que se utilizó en el Ejemplo 6 se pulió con un papel de pulido, para hacer variaciones en la altura de las superficies superiores de las proyecciones. Específicamente, se prepararon un soporte (soporte A) que tenía las proyecciones más bajas unos 30 μm que las otras proyecciones (proyecciones convencionales) y un soporte (soporte B) que tenía cuatro proyecciones más bajas, unos 50 μm que las otras proyecciones. La diferencia de altura entre la superficie de las proyecciones distintas de las proyecciones más bajas (proyecciones convencionales) y la superficie del área plana era de 3 μm o menos. Se preparó una sonda de ADN para la aplicación puntual de manera similar al Ejemplo 6. Después, la solución de sonda de ADN se aplicó puntualmente sobre las superficies de cuatro proyecciones convencionales y cuatro proyecciones más bajas de manera similar al Ejemplo 6. Adicionalmente, se preparó una hibridación de ADN y se hibridó de manera similar al Ejemplo 6, y el soporte hibridado se analizó de manera similar al Ejemplo 6. Las intensidades de fluorescencia medias de las superficies de las proyecciones convencionales y el ruido del área que las rodea, y la intensidad de fluorescencia media de las superficies de las proyecciones más bajas y el ruido medio del área que las rodea se resumen en la Tabla 5.

Tabla 5

	Tipo de soporte	Resultado de proyecciones convencionales		Resultado de proyecciones más bajas	
		Intensidad de fluorescencia	Ruido	Intensidad de fluorescencia	Ruido
Ejemplo 7	Soporte A	21000	30	18500	26
	Soporte B	20800	25	16800	29

Los resultados muestran que se podía obtener una relación S/N mayor en comparación con la de los Ejemplos Comparativos incluso con un sustrato en el que hay alguna fluctuación en la altura de las proyecciones (50 μm o menos).

Además, también se examinó un soporte que tenía una diferencia en altura entre las superficies superiores de las proyecciones y el área plana. Las proyecciones del sustrato de PMMA moldeado por inyección utilizado en el Ejemplo 6 se pulió con un papel de pulido, para hacer dos soportes que tenían diferencias de altura de unos 30 μm (soporte C) y 50 μm (soporte D) entre las superficies del área plana y las superficies superiores de las proyecciones. A saber, el soporte C tiene proyecciones más altas unos 30 μm que el área plana. Se preparó una sonda de ADN para la aplicación puntual y se aplicó puntualmente sobre la superficie de las proyecciones; se preparó un ADN para la hibridación y se hibridó de manera similar al Ejemplo 6; y se analizó el soporte de manera similar al Ejemplo 6. El número de proyecciones en el sustrato sobre el que se aplicó puntualmente la solución de ADN era de cuatro. Se determinaron las medias de intensidad de fluorescencia de los puntos unidos al ADN (cuatro puntos) y el ruido de las áreas que los rodeaban (4 áreas). Los resultados se resumen en la Tabla 6

Tabla 6

	Material de base C		Material de base D	
	Intensidad de fluorescencia	Ruido	Intensidad de fluorescencia	Ruido
Ejemplo 8	19100	32	16500	30

Los resultados muestran que se pudo obtener una relación S/N significativamente mayor en comparación con los Ejemplos Comparativos incluso cuando hay alguna diferencia en altura entre el área plana y la superficie superior de las proyecciones (de 50 μm o menos).

Ejemplo 9 (no de acuerdo con la invención)

Se prepararon placas planas de polimetil metacrilato, polietil metacrilato, y polifenil metacrilato mediante fundición y se sumergieron en una solución acuosa de hidróxido sódico 10 N a 50 °C durante 10 horas. Las placas planas se lavaron con agua purificada, una solución acuosa de HCl 0,1 N, y agua purificada en ese orden. De esta manera, se formaron los grupos carboxilo sobre la superficie de las placas mediante hidrólisis de las cadenas laterales del polímero.

Se inmovilizó una sonda de ADN (la sonda de ADN inmovilizada tenía solamente 60 bases), se preparó una muestra de ADN y se hibridó, y la placa resultante se analizó de manera similar al Ejemplo 1. Los resultados se resumen en

la Tabla 7.

Tabla 7

	Tipo de soporte	Intensidad de fluorescencia	Ruido
Ejemplo 9	Polimetil metacrilato	13100	175
	Polietil metacrilato	12000	190
	Polifenil metacrilato	15000	350

5 Estos resultados demuestran que las placas planas presentan relaciones S/N significativamente mayores, en comparación con los Ejemplos Comparativos.

10 **Ejemplo 10 (no de acuerdo con la invención)**

(Preparación de un soporte con ADN inmovilizado)

15 Se preparó un sustrato similar que el del Ejemplo 6. después, se formó una película de Ni-Cr (la composición Ni/Cr es Ni_8Cr_2) que tenía un espesor de 50 nm sobre el sustrato mediante espurreado. Por separado, se preparó una solución de 1 g de gránulos pulverizados del sustrato (sin la película de Ni-Cr) disueltos en 10 ml de cloroformo. Después, se formó una capa de aislamiento con una película de PMMA sobre la película de Ni-Cr cubriendo con la solución sobre ella mediante revestimiento por centrifugación. Después de retirar la capa de aislamiento y la película de Ni-Cr sobre la superficie superior de las proyecciones con un pulidor, el sustrato se sumergió en una solución de NaOH 10 N a 65 °C y después se lavó con agua purificada, una solución acuosa de HCl 0,1 N, y agua purificada en ese orden. Se inmovilizó entonces una sonda de ADN y se preparó una muestra de ADN de manera similar al Ejemplo 6.

(Hibridación)

25 Se depositaron películas de cromo y oro sobre un cubreobjetos de cristal hasta un espesor de 5 nm y 10 nm respectivamente. Se conectó un cable de oro a esta mediante soldadura. Por separado, se añadieron 50 µl de solución para la hibridación en el área de superficie irregular del soporte donde se había inmovilizado el ácido nucleico preparado anteriormente, y el cubreobjetos anterior se dejó caer sobre la superficie de área irregular con su cara de oro mirando al soporte. En ese momento, se colocó un espaciador de 0,2 mm de grosor entre el soporte y el cubreobjetos de oro para evitar un cortocircuito. El área circundante del cubreobjetos de cristal se selló con papel adhesivo para evitar la evaporación de la solución de hibridación.

35 Después, la película de Ni-Cr sobre el soporte y el ánodo de la fuente de energía se conectaron entre ellos y el oro (cable de oro) del cubreobjetos de cristal al cátodo de la fuente de energía utilizando un cable de oro y una pasta de plata disponible en el mercado para la conexión eléctrica. El soporte se colocó en un horno y se incubó en este a 65 °C durante 15 minutos. Después de la aplicación de una tensión de 1 V a partir de la fuente de energía durante 5 minutos, se retiró el soporte del horno y, después de retirar el cubreobjetos, se lavó y se secó.

40 En consecuencia, se obtuvieron resultados similares a los del Ejemplo 6. De esta manera, incluso si el periodo de incubación es más corto, es posible acortar el periodo de hibridación formando un electrodo en la superficie lateral del a proyección y aplicando un campo eléctrico.

Ejemplo comparativo 4

45 Una placa de 1 mm de grosor que tenía poliacrilonitrilo como componente principal (Zexlon, fabricado por Mitsui Chemicals, Inc.) se cortó en trozos de 75 mm x 25 mm de tamaño. Estos trozos se sumergieron y se dejaron en NaOH 10 N a 70 °C durante 12 horas. Después del lavado, se inmovilizó una sonda de ADN (longitud de la sonda de ADN. 60 bases), y la placa inmovilizada se hibridó con una muestra de ADN de manera similar al Ejemplo 1. Se evaluó la placa de una manera similar al Ejemplo 1, pero no fue posible determinar si la muestra y la sonda se habían hibridado debido a la mayor autofluorescencia. Esto es debido a que la placa era amarillenta y tenía una autofluorescencia extremadamente alta. Cuando se midió en condiciones de una longitud de onda de excitación de 532 nm, una ganancia de fotomultiplicador fijada en 700 y una potencia de láser del 33 % utilizando un GenePix 4000B fabricado pro Axon Instruments, la intensidad de autofluorescencia de la placa plana antes del tratamiento era extremadamente grande de 30.000.

Ejemplo comparativo 5

60 Se copolimerizaron 99 partes por peso de metil metacrilato (MMA) y 1 parte por peso de ácido metacrílico. Después de la purificación, el copolímero se disolvió en un disolvente, y se formó una película de este polímero sobre una placa de PMMA por inmersión. Se inmovilizó una sonda de ADN (de 60 bases de longitud) sobre la película; se hibridó una muestra de ADN de una manera similar al Ejemplo 1, excepto en que la inmersión en el álcali se eliminó,

y se analizó el soporte resultante de manera similar al Ejemplo 1. Como resultado, la intensidad de señal era de 6000 y la intensidad del ruido era de 300.

Ejemplo 11 (no de acuerdo con la invención)

5 Se copolimerizaron 99 partes por peso de metil metacrilato (MMA) y 1 parte por peso de ácido metacrílico. Después de la purificación, el copolímero se disolvió en un disolvente, y se formó una película de este polímero sobre una placa de PMMA por inmersión. Se inmovilizó una sonda de ADN (de 60 bases de longitud) sobre la película; se hibridó una muestra de ADN de una manera similar al Ejemplo 1, excepto en que el soporte se sumergió en la
 10 solución de álcali a 50 °C durante 10 horas, y el soporte resultante se analizó de una manera similar al Ejemplo 1. Como resultado, la intensidad de señal era de 15.000 y la intensidad del ruido era de 150. La razón de que los resultados en este Ejemplo fueran superiores a los del Ejemplo comparativo 5 parece ser la presencia de un tratamiento con un álcali que aumenta la cantidad de grupos carboxilo sobre la superficie del soporte. Se preparó una placa de 1 mm de grosor de un copolímero preparado con 99 partes por peso de metil metacrilato (MMA) y 1
 15 parte por peso de ácido metacrílico por fundición, y cuando se midió en las condiciones de una longitud de onda de 532, una ganancia de foromultiplicador fijada en 700 y una potencia de láser del 33 % utilizando un GenePix 4000B fabricado pro Axon Instruments, la intensidad de autofluorescencia de la placa plana no tratada con un álcali era dede 850.

Ejemplo comparativo 6

20 El mismo ensayo se repitió, excepto en que se eliminó el tratamiento con el álcali (inmersión en una solución de hidróxido sódico) del Ejemplo 1. Como resultado, no se observó fluorescencia que indicara hibridación. Esto parecía deberse a que la ausencia de tratamiento de la superficie con un álcali o un ácido da como resultado la formación de
 25 grupos carbonilo en una cantidad insuficiente dando lugar, con consecuencia, a la disminución de la cantidad de la sonda de ADN inmovilizada

Aplicabilidad industrial

30 La presente invención proporciona un soporte que tiene inmovilizada una sustancia de unión selectiva que es menor en cuanto a la adsorción de muestras no específicas, favorable en cuanto a la eficacia de hibridación, y, en consecuencia, favorable en la relación S/N.

LISTADO DE SECUENCIAS

35 <110> Toray Industries, Inc.
 <120> Un soporte que tiene inmovilizada una sustancia de unión selectiva
 40 <130> TD-04021-PCT
 <160> 8
 <170> PatentIn Ver. 2.1
 45 <210> 1
 <211> 70
 <212> ADN
 <213> Plásmido pKF3
 50 <400> 1

 atcgtaaaga acattttgag gcatttcagt cagttgctca atgtacctat aaccagaccg 60
 ttcatctgga 70
 55 <210> 2
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Plásmido pKF3
 60 <400> 2
 acattttgag gcatttcagt cagttgctca atgtacctat aaccagaccg ttcatctgga 60

ES 2 727 785 T3

<210> 3
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Plásmido pKF3
 5
 <400> 3
 cagttgctca atgtacctat aaccagaccg ttcactgga 40
 <210> 4
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Plásmido pKF3
 10
 <400> 4
 aaccagaccg ttcactgga 20
 <210> 5
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Plásmido pKF3
 20
 <400> 5
 gggcgaagaa gttgtccata 20
 <210> 6
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Plásmido pKF3
 25
 <400> 6
 gcagagcgag gtatgtaggc 20
 <210> 7
 <211> 2246
 <212> ADN
 <213> Plásmido pKF3
 35
 <400> 7
 atggcaacag tcaatcagct ggttcgaaaag ccgcgagctc gtaaagtggc caaatctaac 60
 gttccggctc tcgaggcatg cccgtagaag cgtggcatat gcacacgcgt atacactact 120
 actccgaaga aaccgaattc agcgcctgcgc aagctttgcc gcgtacgcct gaccaacggt 180
 ttcgaggtca cctcatatat aggtggtgaa ggacacaacc tgcaggaaca ctctgttate 240
 ctgatcagag gcggccgcgt taaagatctg cccgggatcc ggtaccacac cgteccgcggc 300
 gctctagact gctccggagt aaaggaccgt cgacaggatc gatcgaaata cgggtgtaaaa 360
 cgtccgaagg cctaatagaa gctagcttgg cactgggcca agctgaattt ctgccattca 420
 tccgettatt atcaattatt caggcgttagc accaggcggt taagggcacc aataactgcc 480
 ttaaaaaaat tacgccccgc cctgccactc atcgcagtac tgttgtaatt cattaagcat 540
 tctgccgaca tggaagccat cacagacggc atgatgaacc tgaatcgcca gcggcatcag 600

40

ES 2 727 785 T3

caccttgctg ccttgcgat aatatttgc catagtgaaa acgggggcca agaagttgtc 660
catattagcc acgtttaaat caaaactggt gaaactcacc caggattgg ctgagacgaa 720
aaacatattc tcaataaacc ctttagggaa ataggccagg ttttcaccgt aacacgccac 780
atcttgcgaa tatatgtgta gaaactgccg gaaatcgctg tggattcac tccagagcga 840
tgaaaacggt tcagtttgct catggaaaac ggtgtaacaa ggggtaacac tatcccatat 900
caccagctca ccgtctttca ttgccatacg aaattccgta tgagcattca tcaggcgggc 960
aagaatgtga ataaaggccg gataaaactt gtgcttattt tcttttacgg tctttaaaaa 1020
ggccgtaata tccagatgaa cggctctggt ataggtagat tgagcaactg actgaaatgc 1080
ctcaaatgt tctttacgat gccattggga tatacaacg gtggtatata cagtgatttt 1140
ttctccatt ttagcttct tagctcctga aaatctgat aactcaaaaa atagcccg 1200
tagtgatctt atttcattat ggtgaaagtt ggaacctctt acgtgccgat caacgtctca 1260
ttttcgcca aagttggccc agggcttccc ggtatcaaca gggacaccag gatttattta 1320
ttctggaag tgatcttccg ttgcacggag ttccactgag cgtcagaccc cgtagaaaag 1380
atcaaaggat cttcttgaga tcttttttt ctgcgcgtaa tctgctgctt gcaaacaaaa 1440
aaaccaccgc taccagcggg ggtttgtttg ccgatcaag agctaccaac tctttttccg 1500
aaggtaactg gcttcagcag agcgcagata ccaatactg tctttctagt gtagccgtag 1560
ttaggccacc acttcaagaa ctctgtagca ccgctacat acctcgtct gctaatcctg 1620
ttaccagtgg ctgctgccag tggcgataag tctgtcttta ccgggttggc ctcaagacga 1680
tagttaccgg ataaggcgca gcggtcgggc tgaacggggg gttcgtgcac acagcccagc 1740
ttggagcgaa cgacctacac cgaactgaga tacctacagc gtgagcattg agaaagcgcc 1800
acgttcccg aaggagagaa ggcggacagg taccggtaa gggcagggt cggaacagga 1860
gagcgcacga gggagcttc agggggaaac gcctggtatc tttatagctc tctcgggttt 1920
cgccacctct gacttgagcg tctgattttg tgatgctcgt caggggggcg gagcctatgg 1980
aaaaacgcca gcaacgcggc ctttttacgg ttctggcct tttgetggcc ttttgetcac 2040
atgttcttct ctgcgttata cctgattct gtggataacc gtattaccgc ctttgagtga 2100
gtgataacc ctcgccgag ccgaacgacc gagcgcagcg agtcagttag cgaggaagcg 2160
gaagaagcat tctgaaatga gctgttgaca attaatcctc gaactagtta actagtacgc 2220
aagttcacgt aaaaagggtg tcgacc 2246

<210> 8
<211> 968
<212> ADN
<213> Plásmido pKF3

ES 2 727 785 T3

<400> 8

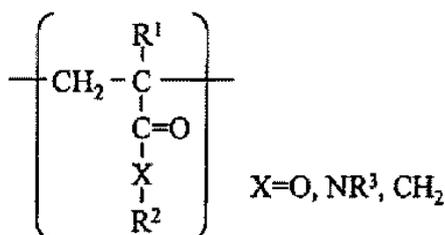
gggcgaagaa gttgtccata ttagccacgt ttaaatacaa actggtgaaa ctcaccagg 60
 gattggctga gacgaaaaac atattctcaa taaacccttt agggaaatag gccaggtttt 120
 caccgtaaca cgccacatct tgcgaatata tgtgtagaaa ctgccggaaa tcgtcgtggt 180
 attcaactcca gagcgatgaa aacgtttcag tttgctcatg gaaaacgggtg taacaagggt 240
 gaacactatc ccatatcacc agctcaccgt ctttcattgc catacgaaat tccgtatgag 300
 cattcatcag gcgggcaaga atgtgaataa aggccggata aaacttgtgc ttatttttct 360
 ttacggctct taaaaaggcc gtaatatcca gatgaacggc ctggttatag gtacattgag 420
 caactgactg aaatgcctca aaatgttctt tacgatgcca ttgggatata tcaacgggtg 480
 tataaccagt gatttttttc tccatttttag cttccttagc tccatgaaaat ctcgataact 540
 caaaaaatac gcccggtagt gatcttattt cattatgggtg aaagttggaa cctcttacgt 600
 gccgatcaac gtctcatttt cgccaaaagt tggcccaggg cttcccggta tcaacaggga 660
 caccaggatt tatttattct gcgaagtgat cttccgttcg acggagttcc actgagcgtc 720
 agaccccgtg gaaaagatca aaggatcttc ttgagatcct tttttctgc gcgtaatctg 780
 ctgcttgcaa acaaaaaaac caccgctacc agcggtggtt tgtttgccgg atcaagagct 840
 accaactctt tttccgaagg taactggctt cagcagagcg cagataccaa atactgtcct 900
 tetagtgtag ccgtagttag gccaccactt caagaactct gtagcaccgc ctacatacct 960
 cgctctgc 968

REIVINDICACIONES

1. Un soporte que tiene inmovilizada una sustancia de unión selectiva, donde el soporte tiene una parte con una depresión que incluye múltiples proyecciones, la superficie del soporte comprende una resina de autofluorescencia baja que tiene una intensidad de fluorescencia de 1.000 o menos, la superficie de la resina comprende grupos carboxilo formados mediante el tratamiento de la resina con un álcali o ácido, y adicionalmente se inmoviliza una sustancia de unión selectiva sobre las superficies superiores de las múltiples proyecciones de la parte con una depresión que incluye múltiples proyecciones mediante los grupos carboxilo de la resina, donde el soporte tiene formada un área plana, y la diferencia de altura entre la superficie superior plana de las proyecciones de la parte con una depresión que incluye múltiples proyecciones y la superficie del área plana es de 50 μm o menos.

donde la intensidad de fluorescencia de la resina de autofluorescencia baja se determina midiendo una placa plana limpia que tiene un grosor de 1 mm utilizando un GenePix 4000B fabricado por Axon Instruments en condiciones de una longitud de onda de excitación de 532 nm, una ganancia de fotomultiplicador fijada en 700 y una potencia de láser del 33 %.

2. El soporte que tiene inmovilizada una sustancia de unión selectiva de acuerdo con la Reivindicación 1, donde la resina de autofluorescencia baja es un polímero que contiene la unidad estructural representada por la siguiente Fórmula general (1):



(1)

en la Fórmula general (1), R1, R2 y R3 representan cada uno un grupo alquilo o arilo o un átomo de hidrógeno.

3. El soporte que tiene inmovilizada una sustancia de unión selectiva de acuerdo con la Reivindicación 2, en el que el polímero de la superficie del soporte contiene la unidad estructural representada por la Fórmula general (1) en una cantidad del 10 % o más con respecto al total de unidades monoméricas.

4. El soporte que tiene inmovilizada una sustancia de unión selectiva de acuerdo con la Reivindicación 2, en el que la sustancia de unión selectiva está inmovilizada en el soporte mediante un enlace covalente entre el grupo amino o hidroxilo de la sustancia de unión selectiva y el grupo carboxilo de la superficie del soporte.

5. El soporte que tiene inmovilizada una sustancia de unión selectiva de acuerdo con la Reivindicación 1 o 2, en el que la sustancia de unión selectiva es un ácido nucleico.

6. El soporte que tiene inmovilizada una sustancia de unión selectiva de acuerdo con la Reivindicación 2, en el que el polímero que tiene la unidad estructural representada por la Fórmula general (1) es el polimetil metacrilato.

7. El soporte que tiene inmovilizada una sustancia de unión selectiva de acuerdo con la Reivindicación 1 o 2, en el que la superficie del soporte tiene color negro.

8. El soporte que tiene inmovilizada una sustancia de unión selectiva de acuerdo con la Reivindicación 7, en el que el polímero que tiene la unidad estructural representada por la Fórmula general (1) contiene negro de carbón.

9. El soporte que tiene inmovilizada una sustancia de unión selectiva de acuerdo con la Reivindicación 2, en el que el soporte tiene al menos una capa del soporte y una capa que tiene inmovilizada una sustancia de unión selectiva, la superficie de la capa que tiene inmovilizada una sustancia de unión selectiva tiene un polímero que tiene una unidad estructural representada por la Fórmula General (1), y la sustancia de unión selectiva está unida a la superficie de la capa de inmovilización de la sustancia de unión selectiva.

10. El soporte que tiene inmovilizada una sustancia de unión selectiva de acuerdo con la Reivindicación 9, en el que la capa del soporte es de cristal o metal.

11. El soporte que tiene inmovilizada una sustancia de unión selectiva de acuerdo con la Reivindicación 1 o 2, en el que las superficies planas superiores de las proyecciones de la parte con una depresión que incluye múltiples proyecciones son sustancialmente planas y las superficies planas superiores de las proyecciones que tienen inmovilizada una sustancia de unión selectiva tienen casi la misma altura.

12. El soporte que tiene inmovilizada una sustancia de unión selectiva de acuerdo con la Reivindicación 1 o 2, en el que la diferencia entre la altura de la proyección más alta y más baja entre las múltiples proyecciones que tienen inmovilizado un sustrato de unión selectiva es de 50 μm o menos.
- 5 13. El soporte que tiene inmovilizada una sustancia de unión selectiva de acuerdo con la Reivindicación 1 o 2, en el que se forma una película de material conductor sobre las superficies laterales de las proyecciones.

Figura 1

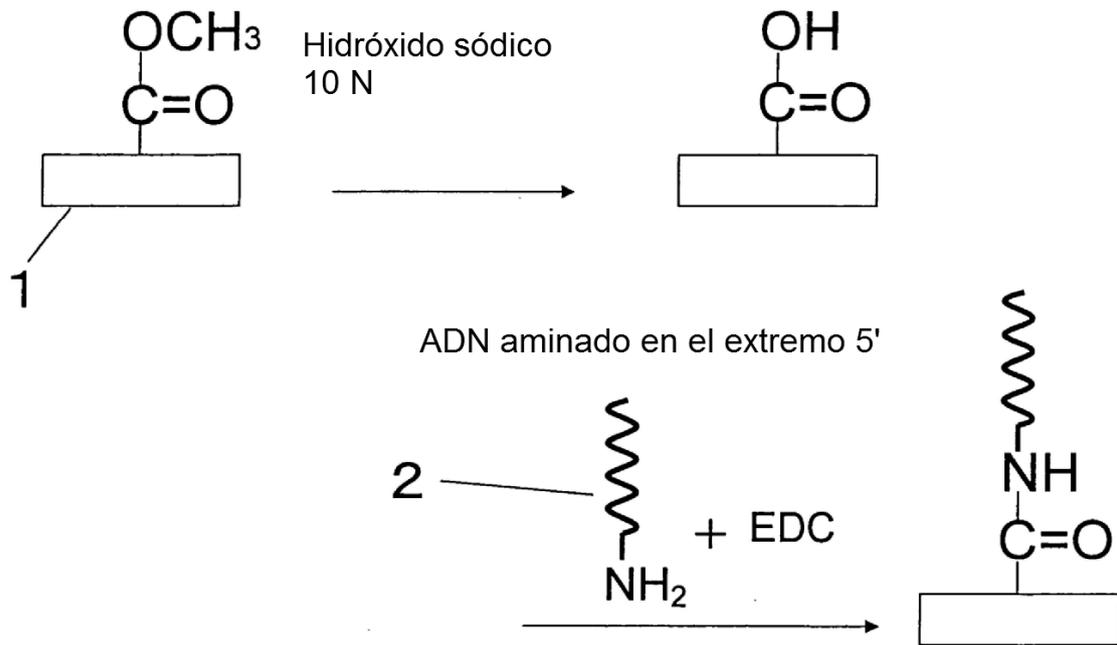


Figura 2

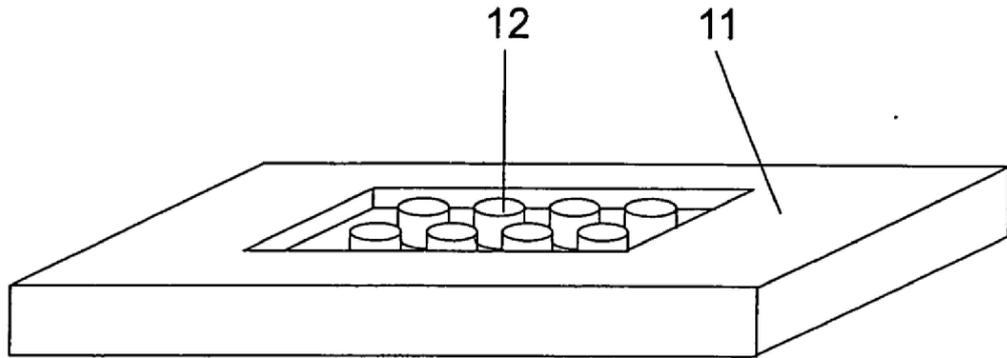


Figura 3

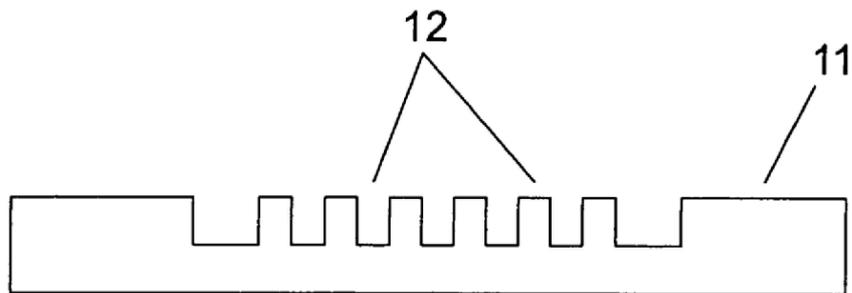


Figura 4

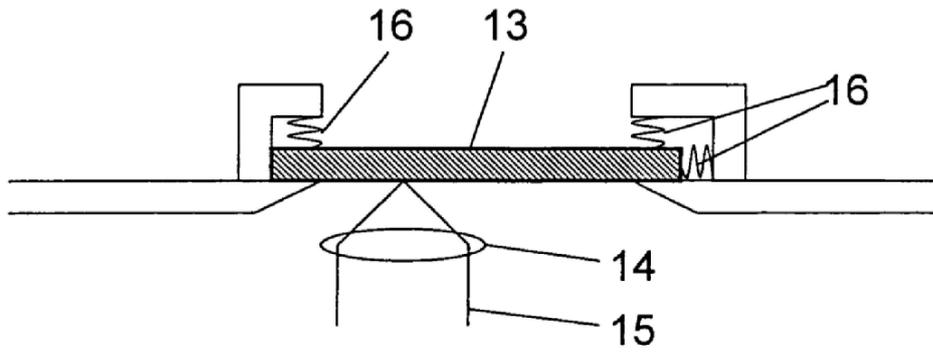


Figura 5

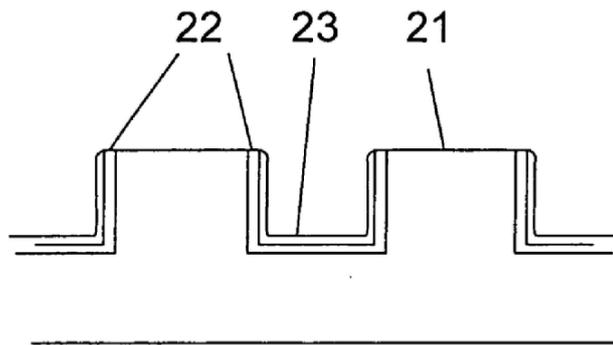


Figura 6

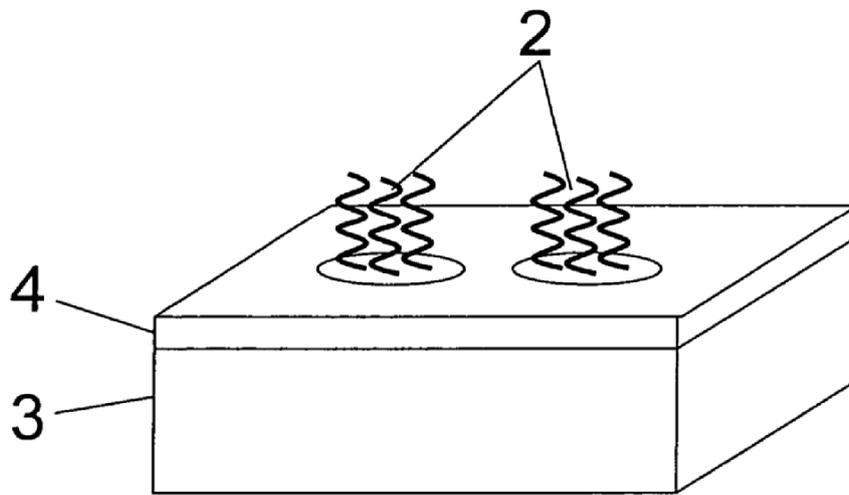


Figura 7

