



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 289 176**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **02799807 .9**

86 Fecha de presentación : **11.12.2002**

87 Número de publicación de la solicitud: **1468277**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **20.10.2004**

54 Título: **Detección de sondas moleculares fijadas a una zona activa de un sensor.**

30 Prioridad: **21.01.2002 FR 02 00676**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.02.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.02.2008

73 Titular/es: **CENTRE NATIONAL DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS)
3, rue Michel-Ange
75794 Paris Cédex 16, FR**

72 Inventor/es: **Bockelmann, Ulrich y
Pouthas, François**

74 Agente: **Esteban Pérez-Serrano, María Isabel**

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

Detección de sondas moleculares fijadas a una zona activa de un sensor.

La presente invención se refiere a un procedimiento de detección de al menos un parámetro representativo de sondas moleculares fijadas a zonas de un sensor.

Ya se conoce un procedimiento de detección de la hibridación de ADN con ayuda de un transistor con efecto de campo, tal como el que se describe en el artículo de E. SOUTEYRAND y colaboradores titulado "Direct Detection of the hybridization of synthetic Homo-Oligomer DNA Sequences by Field Effect" publicado en 1997 en el documento J. Phys. Chem B1997, 101, páginas 2980 a 2985. Un transistor de tipo ISFET ("Ion-Sensitive - Fiel Effect Transistor") utilizable en este tipo de aplicación se ha descrito en el artículo de Piet BERGVELD "Development, Operation and Application of the ISFET as a Tool for Electrophysiology" publicado en el documento IEEE Transactions on Biomedical Engineering volumen BME-19- N° 5 septiembre de 1972 páginas 342 a 351. Pueden encontrarse instrucciones sobre la fabricación de dichas estructuras de transistores en el artículo de V. KIESSLING y colaboradores, titulado "Extracellular Resistance in Cell Adhesion Measured with a Transistor Probe" publicado en el documento Langimur 2000 16, páginas 3517-3521. Finalmente, se ha descrito un modo de preparación de superficies en el artículo de A. KUMAR y colaboradores, titulado "Silanized nucleic acids: a general platform for DNA immobilization" publicado en el documento Nucleic Acid Research 2000, volumen 28, N° 14, páginas i a iv.

En el marco de la presente invención pueden utilizarse particularmente dos procedimientos de fijación de sondas moleculares. El primero consiste en una síntesis directa sobre un sólido tal como la que se describe por ejemplo en el artículo de S. P. A. Fodor y colaboradores titulado "Light-directed, spatially adressable parallel chemical synthesis" publicado en el documento Science 251, páginas 767 a 773 (1991). El segundo es la fijación de las moléculas a partir de una dilución.

En el caso en el que los sensores tienen una pluralidad de zonas activas, por ejemplo chips de ADN o chips de proteínas, actualmente no existe ninguna técnica disponible que permita controlar fácilmente y de manera relativamente rápida sobre que zonas se han fijado eficazmente las sondas moleculares.

Las Patentes US 5.827.482 y US 6.331.274 al igual que la Solicitud de Patente EP 1 460 130 publicada el 26 de junio de 2003 se refieren a procedimientos de detección de la fijación de moléculas en zonas activas utilizando una red de transistores con efecto de campo. En estos documentos no se prevé la fijación del potencial de la solución que recubre las zonas activas.

La presente invención también se refiere a un procedimiento de detección de la fijación de sondas moleculares en al menos una zona de un sensor, o de una interacción, particularmente con vistas a controlar el depósito y la fijación locales de las sondas moleculares, para permitir en particular remediar al menos parcialmente los problemas que plantean las grandes variaciones experimentales que se encuentran frecuentemente en la práctica.

La presente invención también se refiere a un procedimiento de detección de la fijación de sondas moleculares en al menos una zona activa de un sensor o de una interacción, tal como se define en la reivindicación 1.

Entre las etapas a y b, puede preverse un aclarado.

De acuerdo con una realización particular, el procedimiento se caracteriza porque tiene después de a) y antes de b) las siguientes etapas:

a1) aclarado

a2) adición de una solución que contiene moléculas diana capaces de interaccionar específicamente con las sondas moleculares, por ejemplo de hibridar con éstas en el caso en el que las sondas moleculares sean de ADN, opcionalmente seguida de un aclarado.

De acuerdo con otra realización particular, el procedimiento se caracteriza porque tiene, después de c, las siguientes etapas.

d) adición de una solución de electrolito que contiene moléculas diana capaces de interaccionar específicamente con las sondas moleculares, por ejemplo de hibridarse en el caso en el que las sondas moleculares sean de ADN.

e) medir al menos un punto de la característica de corriente de drenaje/ tensión fuente-compuerta/ tensión fuente-drenaje de al menos dos de los transistores de un segundo grupo correspondiente a las zonas que se ponen en contacto con las sondas moleculares y con las moléculas diana, por ejemplo aplicando una tensión por ejemplo constante entre la compuerta y la fuente de estos transistores del segundo grupo cuyo drenaje y fuente se han polarizado o una corriente dada por ejemplo constante en la fuente de estos transistores del segundo grupo, para obtener mediante comparación una detección de al menos una interacción.

El procedimiento puede emplear una pluralidad de dichas mediciones de al menos un punto de la característica, que están separadas en el tiempo. Esto permite una medición doblemente comparativa, en el espacio y en el tiempo.

De acuerdo con una primera variante, la comparación, particularmente mediante medición diferencial, se realiza entre al menos dos transistores correspondientes a zonas que están bañadas con una solución de electrolito, después de ponerlos en contacto con las sondas moleculares.

De acuerdo con una segunda variante preferida, esta comparación, particularmente mediante medición diferencial, se realiza entre al menos un transistor correspondiente a una zona que está bañada con dicha solución de electrolito después de ponerlo en contacto con las sondas moleculares y al menos un transistor que corresponde a una zona que está bañada con dicha solución de electrolito sin haberlo puesto previamente en contacto con las sondas moleculares.

Las sondas moleculares son por ejemplo moléculas de ADN, de ARN o de proteínas.

El procedimiento de acuerdo con la invención es compatible con una detección convencional de interacción molecular mediante fluorescencia.

Otras características y ventajas de la invención serán más evidentes con la lectura de la descripción a continuación junto con los dibujos adjuntos, en los que:

- la figura 1 representa dos transistores con efecto de campo de un chip de detección que comprende una pluralidad de dichos transistores organizados siguiendo una red mono o bidimensional de transistores;

- la figura 2 representa, en vista superior, un detalle de un chip de detección y la disposición de las zonas activas que corresponden cada una a un transistor con efecto de campo;

- la figura 3 ilustra las conexiones eléctricas de drenaje de las transmisiones de la red mono o bidimensional, representando la figura 4 la resistencia de las diferentes conexiones eléctricas de drenaje, representando la curva A los valores calculados y la curva B los valores medidos, debiéndose la separación entre las curvas esencialmente a la resistencia del canal que es constante.

- la figura 5 representa un dispositivo de depósito de la solución sobre las zonas activas seleccionadas;

- la figura 6 ilustra la detección de la presencia de ADN silanizado y de poli-L-lisina con U_{SG} y U_{SD} constantes, mediante modificación de la corriente de drenaje I_{SD} ; y

- la figura 7 ilustra la detección de la presencia de ADN silanizado y de poli-L-lisina con I_{SD} y U_{SD} constantes, mediante detección de la variación de la tensión U_{SG} ;

- las figuras 8A a 8C representan los resultados de experimentos realizados en diferentes condiciones experimentales;

- las figuras 9A a 9D muestran una detección electrónica de ADN;

- y las figuras 10A y 10B ilustran el empleo de canales de microfluidos.

Las figuras 1 a 3 ilustran un sensor que presenta una red de transistores con efecto de campo sobre un sustrato de silicio. En la figura se representa un corte de un transistor T_1 o T_2 que está provisto de una región de fuente S y de una región de drenaje D que presentan cada una un contacto eléctrico y que están coronadas por una capa aislante respectivamente 1 y 2, por ejemplo un óxido térmico de SiO_2 . La región activa 3 entre la fuente S y el drenaje D forma la región de compuerta G del transistor y presenta una capa aislante 4 de grosor reducido, por ejemplo una capa de SiO_2 térmica. También es posible no disponer de óxido sobre esta región activa. La superficie activa se delimita entonces mediante una porción 4' del sustrato que se muestra al desnudo.

Las sondas moleculares, por ejemplo las moléculas de ADN de cadena sencilla, se fijan mediante un procedimiento conocido en al menos algunas de las superficies activas 4 ó 4'. Para el ADN, se utilizan preferiblemente transistores con efecto de campo con canal n de empobrecimiento (para los cuales los portadores de carga son los electrones, más móviles donde aumenta la sensibilidad) con una polarización de compuerta negativa (es decir que el electrolito se polariza negativamente con respecto al semi-conductor), cargándose el ADN negativamente (para un electrolito de pH neutro).

La aplicación de una tensión fuente-drenaje U_{SD} entre la fuente S y el drenaje D (U_{SD1} para T_1 y U_{SD2} para T_2) y de una tensión compuerta-fuente U_{GS} entre el electrolito 6 y la fuente S (por ejemplo con un electrodo E único Ag/AgCl) induce un gas bidimensional de portadores de cargas en el interfaz Si/ SiO_2 , o en el interfaz Si/electrolito de cada transistor. De lo que resulta una corriente de drenaje I_D que, para cada transistor, depende de forma sensible de la carga del interfaz SiO_2 /electrolito o Si/electrolito. Se denomina superficie activa a este interfaz que está frente al canal entre la fuente S y el drenaje D.

ES 2 289 176 T3

La corriente I_D depende de la fijación de las sondas moleculares, por ejemplo de las moléculas de ADN en la superficie activa 4 6 4'.

Como muestran las figuras 2 y 3, n estructuras de tipo transistor con efecto de campo se integran en un sustrato de silicio recubierto de un aislante (SiO_2 u otro) y provisto de conexiones apropiadas (metalización o preferiblemente regiones conductoras dopadas) mediante la puesta en contacto eléctrico de la fuente 10 y del drenaje (D_1, \dots, D_n). A diferencia de una estructura de transistor MOS convencional, no hay electrodo metálico de compuerta. Esto corresponde a la estructura de tipo "ISFET" ("Ion Sensitive Field Effect Transistor"). Se utiliza preferiblemente un sustrato de tipo SOI (silicio sobre aislante) que proporciona una mayor sensibilidad.

Las diferentes estructuras están a una distancia lateral reducida una con respecto a la otra y sus superficies activas están en contacto con la misma solución de medición. Un tamaño lateral típico en la micro-electrónica actual es inferior al μm . En la tecnología de chips de ADN tal como la que se emplea en la presente invención, el tamaño lateral es de 5-10 μm para una síntesis directa sobre el sólido y de 50-100 μm en el caso de una fijación de moléculas a partir de una dilución.

En la presente configuración de medición paralela, varios transmisores eléctricos con diferentes tipos de sondas moleculares están en contacto con la misma solución de medición y al menos una estructura de transistor se sitúa por debajo de cada transmisor eléctrico. El empleo de varios transistores por transmisor eléctrico es posible en vista de los tamaños mencionados anteriormente y permite una redundancia en la detección.

Se utiliza un electrodo E (por ejemplo $\text{Ag}/\text{Ag}/\text{Cl}$), para fijar el potencial de la solución de medida 6 (electrolito) con respecto a la estructura de silicio a la que recubre y para fijar el punto de trabajo de los sensores (transistores). El potencial del electrolito 6 puede ser en este caso igual a cero. La solución de medición 6 que baña los sensores contiene iones a una concentración que da una conductividad suficiente y que no da lugar a una polarización demasiado grande a nivel de las superficies activas. Su pH es preferiblemente neutro.

El procedimiento de detección de los reconocimientos moleculares se basa en un enfoque de comparación particularmente diferencial. La medición se realiza utilizando varias estructuras de transistor en paralelo. La medición puede ser diferencial con respecto a los diferentes tipos de moléculas injertadas e incluir opcionalmente varios transistores por tipo de molécula. También es posible comparar las señales de antes/después de la reacción que muestra el reconocimiento molecular (y/o la evolución durante esta reacción).

El procedimiento de acuerdo con la invención permite evitar las dificultades asociadas con la sensibilidad de un sensor individual al pH y a la fuerza iónica y las asociadas con una variabilidad de un transistor individual con respecto a otro (esto incluye la estructura de transistor y la calidad de la fijación de las sondas).

Un procedimiento de acuerdo con una realización preferida emplea las siguientes etapas:

- a) tratamientos homogéneos de toda la superficie aislante para preparar la fijación de las sondas moleculares;
- b) injerto local de diferentes tipos de sondas moleculares en al menos algunas de las superficies activas individuales;
- c) aclarados homogéneos;
- d) medición electrónica: añadir el electrolito de medición, sumergir el electrodo y medir los transistores (por ejemplo uno o varios puntos de la característica I_D en función de U_{SD} y de U_{SG}) y comparar los resultados obtenidos de acuerdo con los transistores;
- e) aclarados homogéneos;
- f) y opcionalmente adición de la solución de moléculas diana en presencia de electrolito y reacción de reconocimiento;
- g) aclarados homogéneos;
- h) medición electrónica, como (d).

En caso de empleo de las etapas f a h, es posible omitir c y d, es decir realizar solamente una medición electrónica.

Algunos transistores que no se han colocado en presencia de sondas moleculares (o bien un solo transistor) pueden servir como controles. Se miden sus características después de la adición del electrolito de medición que por ejemplo, baña el conjunto de transistores.

El injerto de las sondas moleculares se realiza mediante depósito de micro-gotitas de diámetro aproximadamente 100 μ sobre las superficies activas de los transistores con ayuda de micro-plumas metálicas que están disponibles en el mercado.

ES 2 289 176 T3

Como muestra la figura 3, la red de n transistores (por ejemplo $n = 96$ transistores) presenta n conexiones de drenaje $D_1, D_2 \dots D_n$ y 2 conexiones (no se representan) equivalentes a la fuente común. Las resistencias de la serie R_c asociadas a estas conexiones tienen valores que dependen del índice $1 \dots n$ de drenaje.

5 Los valores de estas resistencias R_c , realizados por ejemplo mediante dopaje de silicio, no pueden despreciarse.

A tal efecto las resistencias R_c de conexión de drenaje se calculan a partir de las longitudes y de las secciones geométricas de las líneas dopadas cuya resistividad se conoce. El cálculo se compara con una medición de la resistencia en función del índice del drenaje aplicando una tensión continua (por ejemplo $U_{SD} = 0,1 \text{ V}$ y $U_{SG} = 2 \text{ V}$). Esto permite
10 obtener una curva de compensación que se da como ejemplo en la figura 4.

Una instalación como la que se representa en la figura 5 puede utilizarse para la realización del procedimiento: sobre una tabla 10, se dispone una pletina 12 que incorpora un dispositivo de mando con micro-controlador para una tabla 11 que asegura un desplazamiento de acuerdo con tres direcciones perpendiculares X, Y, Z. Un chip 15
15 incorpora la red de n transistores se dispone sobre un soporte 14. se emplea otra pletina 20 que tiene una tabla 21 que asegura un desplazamiento de acuerdo con las tres direcciones X, Y y Z para mover un brazo 2 que tiene una micro-pluma o una pipeta 23 para asegurar el depósito de las micro-gotitas sobre al menos algunos de los n transistores. Un objetivo 17 y/o una cámara acoplada a una pantalla 19 permiten observar el depósito de las micro-gotitas y controlar las operaciones.

20 Las mediciones de corriente de drenaje I_D se realizan por ejemplo con $U_{SG} = 1 \text{ V}$ y $U_{SD} = 0,9 \text{ V}$ y un electrolito de pH neutro depositado que está compuesto por KCl con un contenido de 0,1 milimol por litro. Teniendo los transistores (canal p de acumulación) sus fuentes interconectadas, la tensión de fuente o la tensión de compuerta pueden servir de referencia de tensión (por ejemplo la tensión de masa).

25 A continuación se describirá una realización del procedimiento junto con la figura 6.

Antes de estas mediciones, se realiza un tratamiento global de la superficie de la estructura de Si/SiO₂ mediante 1-2 minutos de incubación en ácido sulfocrómico y aclarado en una corriente de agua desionizada y después 3 a 5
30 minutos de incubación en una solución de NaOH (60 μl de NaOH 16 N, 420 μl de etanol y 220 μl de agua) y finalmente aclarado en una corriente de agua desionizada.

La diferencia entre dos mediciones realizadas antes del depósito local pero antes y después de un aclarado con agua se presenta en cuadros pequeños en la figura 6. Las cruces representan la diferencia entre una medición realizada
35 después del depósito local de dos soluciones diferentes y una medición realizada antes del depósito (la medición realizada antes del aclarado con agua).

Con una punta comercial 23 (Telechem SMP3B) montada sobre el dispositivo 22 presente en la figura 5, se deposita una solución 1 sobre los transistores 5-7 (con un contacto entre punta y superficie), los transistores 19-
40 21 y los transistores 33-37 y una solución 2 sobre los transistores 66-69, los transistores 76-79 y los transistores 87-89.

Solución 1: 0,5 μl de oligonucleótido 20mero modificado con tiol en 5' a 1 nmol/ μl , 9 μl de acetato de sodio 30 mM a pH 4,3, 0,5 μl de mercaptosilano 5 mM en acetato de sodio, que se deja reaccionar una hora a temperatura
45 ambiente, antes del depósito.

Solución 2: Poli-L-lisina (al 0,01% en peso/volumen "p/v" final (P8920, Sigma)) en un tampón PBS 0,1X a pH 7.

Después de los depósitos locales, la muestra se seca 15 minutos en atmósfera húmeda y a continuación 5 minutos
50 a 50°C.

La poli-L-lisina es positiva en el electrolito de medición (pH neutro) por causa de los grupos amino ionizados. La disminución de la corriente observada sobre los depósitos de poli-L-lisina es compatible con la adsorción de una carga
positiva sobre la superficie.

55 Para la solución 1, la modificación de silano sobre ADN reacciona con los grupos OH de SiO₂ y el ADN se carga negativamente en solución.

Las soluciones 1 y 2 dan por lo tanto señales de signos opuestos.

60 Otra realización del procedimiento se describirá a continuación junto con la figura 7.

Se mide la diferencia de potencial de superficie ΔU_{SG} correspondiente a la medición antes/después del depósito. Para determinar ΔU_{SG} , se mide la característica bidimensional por ejemplo $I_D(U_{SG}, U_{SD})$ y se determinan las características intrínsecas de los 96 transistores corrigiendo numéricamente en función de las resistencias R_c las líneas de
65 drenaje en serie. La modificación del estado del interfaz de SiO₂ induce un cambio de la característica intrínseca que corresponde a un desfase ΔU_{SG} con U_{SD} y corriente de drenaje I_D constantes. Este desfase permite obtener directamente una medición independiente del punto de trabajo del transistor, en oposición al cambio de corriente ΔI_D presente en la

figura 6. El valor ΔU_{SG} permite en una primera aproximación cuantificar el cambio del interfaz $\text{SiO}_2/\text{líquido}$ inducido por el depósito local. De acuerdo con una variante, se modifica U_{SG} para mantener I_D constante.

Las figuras 8A a 8C muestran mediciones diferenciales realizadas antes y después del depósito de poli-L-lisina (figura 8A), realizadas en función de la concentración de KCl (figura 8B) y realizadas en función de la concentración de poli-L-lisina depositada.

En la figura 8A, las variaciones ΔI_D de la corriente de drenaje I_D se representan en ordenadas para cada uno de los transistores 60 a 96 identificados en abscisas ($U_{SG} = 1 \text{ V}$, $U_{SD} = 0,9 \text{ V}$ y electrolito KCl a $0,1 \text{ mM}$). Las diferencias ΔI_D entre dos mediciones realizadas antes de un depósito local pero separadas por un aclarado con agua se representan mediante círculos. Las diferencias ΔI_D que corresponden a las mediciones realizadas antes y después de un depósito local de poli-L-lisina se representan mediante asteriscos. Después del depósito local se deja la muestra 15 minutos a temperatura ambiente en medio húmedo, antes de secarla a 50°C durante 5 minutos. La dilución C_0 de la poli-L-lisina es del 0,01% peso/volumen “P/V” final (P8920, Sigma) en un tampón PBS $0,1 \times$ a pH 7.

En la figura 8B, se miden las diferencias ΔU_{SG} de la tensión de fuente-rejilla U_{SG} , sobre una parte de los transistores de una red de 62 transistores FET con $U_{SD} = 1,2 \text{ V}$ e $I_D = 50 \mu\text{A}$. Las diferencias entre una medición de referencia (realizada antes del depósito local y con una concentración de KCl de $0,01 \text{ mM}$) y de dos series de mediciones (realizadas después del depósito local de poli-L-lisina y con diferentes concentraciones de KCl) se representan mediante círculos y asteriscos. Aquí se ha realizado un depósito local de poli-L-lisina en dos zonas distintas con la misma dilución C_0 que en el caso de la figura 8A. Durante cada una de las dos series de medición, se modifica la concentración de KCl en el tampón de medición entre $0,01 \text{ mM}$ y 100 mM , pasando por los valores $0,1 \text{ mM}$, 1 mM y 10 mM . Entre las dos series de medición, se aclara la superficie con agua. Se constata una sensibilidad apreciable de la detección de la poli-L-lisina para concentraciones de KCl entre $0,01 \text{ mM}$ y 1 mM y la altura de los picos disminuye progresivamente más allá de estos valores.

La figura 8C muestra las variaciones ΔU_{SG} de la tensión U_{SG} en función de la concentración de polímero depositado (poli-L-lisina), a saber $2C_0$, C_0 , $C_0/2$, $C_0/4$, $C_0/8$ en un tampón PBS $x 0,1$ pH 7, teniendo C_0 el valor indicado por las mediciones de la figura 8A. Las condiciones de medición son las siguientes: $U_{SD} = 1 \text{ V}$, $I_D = 100 \mu\text{A}$ y una concentración de $0,01 \text{ mM}$ para KCl. Estas mediciones muestran que no se produce ninguna ventaja en las condiciones experimentales seleccionadas al aumentar la concentración más allá de C_0 .

Las figuras 9A a 9D muestran la detección electrónica de ADN. Las tensiones U_{SG} y las variaciones ΔU_{SG} de la tensión U_{SG} corresponden a un punto de funcionamiento $U_{SD} = 1 \text{ V}$, $I_D = 100 \mu\text{A}$ y a una concentración de $0,01 \text{ mM}$ de KCl. Estas tensiones se obtienen a partir de la característica $I_D(U_{SG}, U_{SD})$ y se presentan sobre las curvas en abscisas con el número de transistores FET (1 a 96).

Los asteriscos representan la medición antes del tratamiento de superficie inicial con sosa tal como se ha indicado anteriormente junto con la figura 6. Los círculos representan la medición después de la incubación de poli-L-lisina sobre toda la red. Para permitir una inmovilización del ADN, se incuba la red de transistores FET durante 30 minutos en una dilución de poli-L-lisina (concentración C_0). A continuación, sin realizar un secado previo, se aclara con agua y a continuación se seca al aire. La incubación conduce a desfases de la tensión U_{SG} de un valor de $97 \pm 50 \text{ mV}$ (estadística sobre 67 superficies preparadas) que reducen las variaciones entre transistores en la señal electrónica. Estos desfases son compatibles con los observados con los valores medidos en relación con la figura 8C sobre los depósitos locales a la misma concentración. Los cuadros representan las mediciones después del depósito local de oligonucleótidos (5' Cy-5 modificados 20mero, concentración $50 \mu\text{M}$ en agua desionizada) alrededor de los transistores N° 30, 60 y 90. Al nivel de gris y por encima de la figura 9A, se representa la imagen en microfluorescencia de los tres puntos de ADN mencionados anteriormente.

La figura 9B muestra la detección electrónica y mediante fluorescencia de oligonucleótidos Cy5 modificados. Los puntos representados mediante asteriscos han sido obtenidos mediante diferencia ΔU_{SG} entre dos mediciones electrónicas realizadas antes y después de 4 depósitos locales con diferentes concentraciones de ADN (Ref. = $0 \mu\text{M}$, $5 \mu\text{M}$, $10 \mu\text{M}$, $20 \mu\text{M}$). Estos puntos muestran la variación ΔU_{SG} de la tensión U_{SG} que se observa en las características de los transistores y que se debe a los depósitos locales de ADN. Los cuadros muestran la intensidad de la fluorescencia medida en los transistores FET secos, una vez que se ha realizado la medición electrónica con el electrolito. Se observará que se obtiene la misma detección electrónica con oligonucleótidos del mismo tipo, pero sin modificar.

La figura 9C muestra la detección de ADN de doble cadena después del depósito macroscópico de dos productos sobre dos zonas A y B de los transistores FET. Con una micro-pipeta, se depositan $0,15 \mu\text{l}$ prelavados en dos tubos A y B sobre dos regiones respectivas de la red de transistores con efecto de campo FET. La red se ha recubierto previamente con poli-L-lisina para inmovilizar el ADN y se ha medido para que sirva como referencia. La zona A (transistores 1 a 20) de la figura 9C se ha recubierto con la solución del tubo A y la zona B (transistores 50 a 90) con la solución del tubo B dejando que exista entre ellas una región central (transistores 21 a 49) sin recubrir. Se incuba durante 15 sin secar y después se aclara con agua y a continuación se miden los transistores de la red. Los transistores 1 a 20 (zona A) se han incubado con una solución que contiene los productos de una reacción de polimerización en cadena (PCR) obtenidos en el tubo A de acuerdo con el procedimiento descrito a continuación. En esta zona se constata un desfase hacia la base con respecto a la zona B (transistores 50 a 90) y con respecto a dicha zona no incubada entre A y B.

ES 2 289 176 T3

En efecto, la solución de referencia empleada en la zona B se ha seleccionado para que no produzca ADN de doble cadena (tubo B de acuerdo con el procedimiento descrito a continuación).

El la figura 9D, en la región MUT (transistores 1 a 35) sobre la que se ha depositado una solución obtenida mediante amplificación por PCR en las condiciones descritas a continuación, a partir de ADN que tiene una mutación, se observa un desfase hacia la base de ΔU_{SG} , mientras que en la región de referencia WT, para la que el ADN de partida no tiene mutación, no se observa dicho desfase.

Para el experimento de la figura 9C, la técnica de amplificación por PCR de un fragmento de ADN de 1009 pares de bases emplea el ADN del bacteriófago λ digerido con la enzima BstEII utilizando dos cebadores:

5' - CCG CGA ACT GAC TCT CCG CC

y 5' - CAG GCG GCA GGG CTG ACG TT.

El protocolo de PCR se realiza en un termociclador comercial:

- inicio durante 3 minutos a 94°C

- 30 ciclos de desnaturalización / hibridación / extensión de 30 segundos a 94°C / 30 segundos a 57°C / y 2 minutos a 72°C.

Se realiza una etapa final de PCR durante 3 minutos a 72°C.

Para un volumen de 50 microlitros, se utilizan 10 nanogramos de ADN λ digerido con Bst EII, 20 picomoles para cada uno de los cebadores y los cuatro dNTP tienen una concentración final de 50 μ M cada uno. Se colocan 0,5 microlitros de polimerasa TAQ (a 1 U/ μ l) de Roche Diagnostics en el tampón convencional de reacción de PCR (suministrado con la polimerasa TAQ). Esto corresponde a la preparación del tubo A para la zona A. En el tubo de referencia B (que corresponde a la zona B), se sustituye uno de los cuatro dNTP. A saber el dTTP por dCTP, para conservar la misma concentración total de dNTP, lo que inhibe la síntesis del producto de ADN de doble cadena.

Los productos de PCR, en uno y otro caso, se purifican dos veces en columnas "QIAQUICK" de la compañía QIAGEN y se eluyen con un tampón de Tris-Cl de pH 8,5 a una concentración de 10 mM.

La amplificación por PCR específica de la mutación empleada en el marco del experimento correspondiente a la figura 9D parte de un fragmento del gen humano CX-26 (código de acceso M 86849, cromosoma 13q11-12). Este gen se amplifica a partir de ADN genómico procedente de uno o varios pacientes. La técnica de PCR emplea condiciones y cebadores de ciclación descritos en los artículos de F. DENOYELLE y colaboradores utilizados para el primer documento "Prelingual Deafness: high prevalence of a 30delG mutation in the connexin 26 gene" publicado en Human Molecular Genetics, 1997, vol. 6 N° 12, págs. 2173 a 2177 y para el segundo documento "Clinical features of the prevalent form of childhood deafness, DFNB1, due to a connexin-26 gene defect: implications for genetic counselling" publicado en THE LANCET vol. 353, 17 de abril de 1999, págs. 1298 a 1303. Se utiliza una polimerasa Pwo (de Roche Diagnostics) en un tampón de PCR con $MgSO_4$ a 1,5 mM. Los cebadores son GAP1F y CONNR (véase el segundo artículo mencionado anteriormente de F. DENOYELLE, pág. 1299 columna de la derecha antes del último párrafo) y las condiciones experimentales son las del primer artículo mencionado anteriormente del mismo autor (pág. 2177). Se utiliza una concentración final de 0,6 μ M para cada uno de los cebadores y de 0,2 mM para cada uno de los dNTP.

Los productos de PCR se purifican en columnas "QIAQUICK" de la compañía QIAGEN y después de una dilución (de 10.000 veces) sirven de ADN de partida en la reacción específica de la mutación que tiene lugar a continuación.

Se selecciona la amplificación por PCR para permitir la detección de la mutación 35delG (o 30delG) en el gen CX26, gracias a cebadores específicos de esta mutación. Las condiciones de ciclo y las secuencias de los cebadores se proporcionan en el artículo de G. LUCOTTE y colaboradores titulado "PCR test for diagnosis of the common GJB2 (connexin 26) 35delG mutation on dried blood spots and determination of the carrier frequency in France" publicado en el documento Molecular and Cellular Probes (2001) 15, págs. 57 a 59. Se utilizan 20 picomoles de cada uno de los oligonucleótidos cebadores para un volumen final de 50 μ l.

Los dos cebadores específicos de la mutación (véase el artículo de LUCOTTE mencionado anteriormente, página 58, columna de la derecha M primer y N primer) y un cebador común (C primer) se utilizan para sintetizar los productos de PCR de 197 pares de bases. Se realizan dos reacciones de PCR específicas en cada muestra de ADN, la primera de estas reacciones se realiza con el primer cebador específico y da un producto si la mutación está presente en el ADN de partida. La segunda reacción se realiza con el segundo cebador específico y da un producto si la mutación no está presente en el ADN de partida. Esto permite determinar si una muestra es normal, heterocigótica u homocigótica con respecto a esta mutación.

Para un volumen de 50 μ l de medio reactivo, en un tampón de PCR convencional, se utiliza un microlitro de ADN procedente de la preamplificación descrita anteriormente, 30 picomoles de cada uno los cebadores, dNTP a un contenido de 100 μ M y 1 microlitro de polimerasa TAQ (1 U/ μ l) de Roche Diagnosis. Los productos de PCR se

purifican dos veces en columnas "QIAQICK" de la compañía QIAGEN y se eluyen con un tampón Tris-Cl 10 mM de pH 8,5. Para los tubos WT y MUT, se ha utilizado el mismo par de cebadores: C-primer y M-primer. La única diferencia es el ADN de partida.

Las figuras 10A y 10B muestran un circuito integrado que presenta transistores T dispuestos en una línea (o varias líneas). Dos canales de microfluído (por ejemplo paralelos) C_1 y C_2 de un sustrato 30 permiten poner uno o varios transistores T con efecto de campo en contacto con la solución que circula en un canal C_1 y/o C_2 . El material de un sustrato 30 que tiene los canales de microfluído (o capilares) puede ser un polímero PSMS (polidimetilsiloxano) u otro, vidrio, silicio, etc.

De este modo es posible realizar mediciones diferenciales a partir de dos soluciones que circulan en los dos canales C_1 y C_2 . También es posible realizar en un mismo sustrato 30 gran cantidad de dichos canales de microfluído, estando el sustrato sobre el que se disponen estos canales unido a un sustrato semi-conductor en el que se integran los transistores con efecto de campo FET. También es posible medir una variación en el interior de un canal dado. Esta variación puede ser en el tiempo. También es posible inyectar diferentes soluciones en un punto dado en un capilar y el perfil de las concentraciones permanece sin cambios a lo largo del canal, incluso lejos del punto de inyección. Nos remitiremos al artículo de Paul J. A. KENIS *et al.*, titulado "Microfabrication inside Capillaries Using Multiphase Laminar Flow Patterning" publicado en SCIENCE, vol. 285, el 2 de julio de 1999, págs. 83-85 (particularmente figura 1A).

Una técnica de análisis que emplea microfluidos se describe en el artículo "Monolithic integrated microfluidic DNA amplification and capillary electrophoresis analysis system" de Eric T. LAGALLY y colaboradores publicado en el documento Sensors and Actuators B 63 (2000) págs. 138-146.

Documentos citados en la descripción

Esta lista de los documentos citados por el solicitante se ha incluido exclusivamente como información para el lector y no es parte de la patente europea. Se ha recopilado con la mayor exactitud posible; sin embargo, la OEP no asume ninguna responsabilidad por los errores u omisiones que hubiere.

Patentes citadas en la descripción

- US 5827482 A [0005]
- EP 1460130 A [0005]
- US 6331274 B [0005]

Bibliografía no de patentes citada en la descripción

• E. SOUTEYRAND. Direct Detection of the hybridization of synthetic Homo-Oligomer DNA Sequences by Field Effect. *Ie J. Phys. Chem. B* 1997, 1997, vol. 101, 2980-2985

• PIET BERGVELD Development, Operation and Application of the ISFET as a Tool for Electrophysiology. *IEEE Transanctions on Biomedical Engineering*, 05 de septiembre de 1972, vol. BME-19, 342-351 [0002]

• V KIESSLING. Extracellular Resistance in Cell Adhesion Measured with a Transistor Probe. *Langmuir*, 2000 vol. 16, 3517-3521 [0002]

• A. KUMAR. Silanized nucleic acids: a general platform for DNA immobilization. *Nucleic Acid Research*, 2000, vol. 28 (14), i-iv [0002]

• S. P. A. FODOR. Light-directed, spatially adressable parallel chemical synthesis. *Science*, 1991, vol. 251, 767-773 [0003]

• F. DENOYELLE. Prelingual Deafness: hight prevalence of a 30delG mutation in the connexin 26 gene. *Human Molecular Genetics*, 1997, vol. 6 (12), 2173-2177 [0062]

• Clinical features of the prevalent form of childhood deafness. DFNB1, due to a connexin-26 gene defect:: implications for genetic counselling. *THE LANCET*, 17 de abril 1999, vol. 353, 1298-1303 [0005]

• *Molecular and Cellular Probes*, 2001, vol. 15, 57-59 [0064]

• PAUL J. A. KENIS *et al.* Microfabrication inside Capillaries Using Multiphase Laminar Flow Patterning. *SCIENCE*, 02 de Julio de 1999, vol. 285, 83-85 [0068]

• ERIC T. LAGALLY. onolithic integrated microfluidic DNA amplification and capillary electrophoresis analysis system. *Sensors and Actuators B*, 2000, vol. 63, 138-146 [0069]

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de detección de la fijación de sondas moleculares en zonas activas de un sensor o de una interacción, **caracterizado** porque dicho sensor está compuesto por una red de transistores con efecto de campo (T1, T2,...) de los cuales cada uno presenta una región de fuente (S), una región de drenaje (D) y una región de compuerta que constituye una dicha zona activa (3) en la que dicha fijación o dicha interacción debe detectarse fijando el potencial de una solución de medición que recubre dichas zonas activas (3) gracias a un electrodo de compuerta sumergido en dicha solución de medición (E) y porque comprende las siguientes etapas:

- a) poner en contacto algunas de dichas zonas (3) con sondas moleculares para realizar su fijación,
- b) bañar en una solución de electrolito (6) al menos las zonas que se han puesto en contacto con las sondas moleculares,
- c) medir al menos un punto de la característica de corriente de drenaje/tensión fuente-compuerta/tensión fuente-drenaje de al menos dos de los transistores de un primer grupo correspondiente a al menos una zona activa (3) puesta en contacto con sondas moleculares para deducir a partir de esto una dicha fijación o una dicha interacción mediante comparación entre al menos dos de dichas mediciones obtenidas para dos zonas diferentes.

2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado** porque dicha medición de al menos un punto de la característica emplea la aplicación de una tensión dada (U_{DS}) entre el drenaje y la fuente de al menos dichos dos transistores del primer grupo y la aplicación de una tensión dada (U_{GS}) entre la compuerta y la fuente de estos transistores del primer grupo.

3. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque presenta entre a y b una etapa de aclarado.

4. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque comprende después de a) y antes de b) las siguientes etapas:

- a1) aclarado
- a2) adición de una solución que contiene moléculas diana capaces de interaccionar específicamente con las sondas moleculares.

5. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque comprende después de c, las siguientes etapas:

- d) adición de una solución de electrolito (6) que contiene moléculas diana capaces de interaccionar específicamente con las sondas moleculares.
- e) medir al menos un punto de la característica de corriente de drenaje/tensión fuente-compuerta/tensión fuente-drenaje de al menos dos de los transistores de un segundo grupo correspondiente a al menos una zona activa (3) puesta en contacto con las sondas moleculares y con las moléculas diana para obtener mediante comparación una detección de al menos una interacción.

6. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, **caracterizado** porque, en el punto e, la medición de la menos un punto de la característica emplea la aplicación de una tensión dada (U_{DS}) entre el drenaje y la fuente de los transistores de al menos dichos dos transistores del segundo grupo y la aplicación de una tensión dada (U_{GS}) entre la compuerta y la fuente de estos transistores del segundo grupo.

7. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 5 ó 6, **caracterizado** porque emplea una pluralidad de dichas mediciones de al menos un punto de la característica, que están separadas en el tiempo.

8. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque dicha comparación se realiza mediante medición diferencial.

9. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque la comparación se realiza entre mediciones realizadas sobre al menos dos transistores correspondientes a zonas (3) que están bañadas con una solución de electrolito (6) después de ponerlas en contacto con sondas moleculares.

10. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizado** porque la comparación se realiza entre mediciones realizadas sobre al menos un transistor correspondiente a una zona (3) que está bañada con una solución de electrolito (6) después de ponerla en contacto con sondas moleculares con vistas a su fijación y sobre al menos un transistor correspondiente a una zona que está bañada con una solución de electrolito (6) sin ponerla en contacto con sondas moleculares.

11. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque las sondas moleculares son moléculas de ADN, de ARN o de proteínas.

5 12. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 11, **caracterizado** porque las sondas moleculares son moléculas de ADN y porque los transistores con efecto de campo son del tipo de canal n de empobrecimiento, con una polarización de compuerta negativa.

10 13. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 11 ó 12, **caracterizado** porque emplea una detección mediante comparación entre dos zonas que comprenden cada una al menos un dicho transistor con efecto de campo, estando la primera zona bañada con una solución obtenida a partir de una reacción enzimológica que da un producto detectable específico de la presencia o de la ausencia de una mutación en una primera muestra de ADN y estando la segunda zona bañada con una solución obtenida a partir de una reacción enzimológica que da un producto de ADN específico de la presencia o de la ausencia de una mutación en una segunda muestra de ADN.

15 14. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 13, **caracterizado** porque la primera y la segunda muestras de ADN proceden de dos pacientes y porque la reacción enzimológica es la misma para las dos muestras.

20 15. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 13, **caracterizado** porque la primera y la segunda muestras de ADN son iguales y proceden del mismo paciente y porque la reacción enzimológica en la primera zona se realiza en condiciones experimentales que producen un producto de ADN en ausencia de mutación en la primera muestra y porque la reacción enzimológica en la segunda zona se realiza en condiciones experimentales que producen un producto de ADN en presencia de una mutación en la segunda muestra.

25 16. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque comprende la circulación a través de al menos un canal de microfluído de una solución para ponerla en contacto con al menos un dicho transistor con efecto de campo (T_1 , T_2 , ...).

30

35

40

45

50

55

60

65

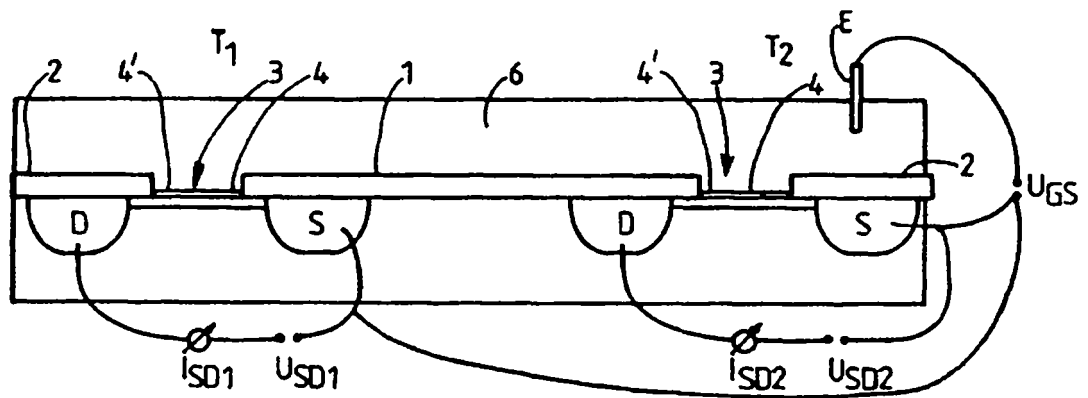


FIG.1

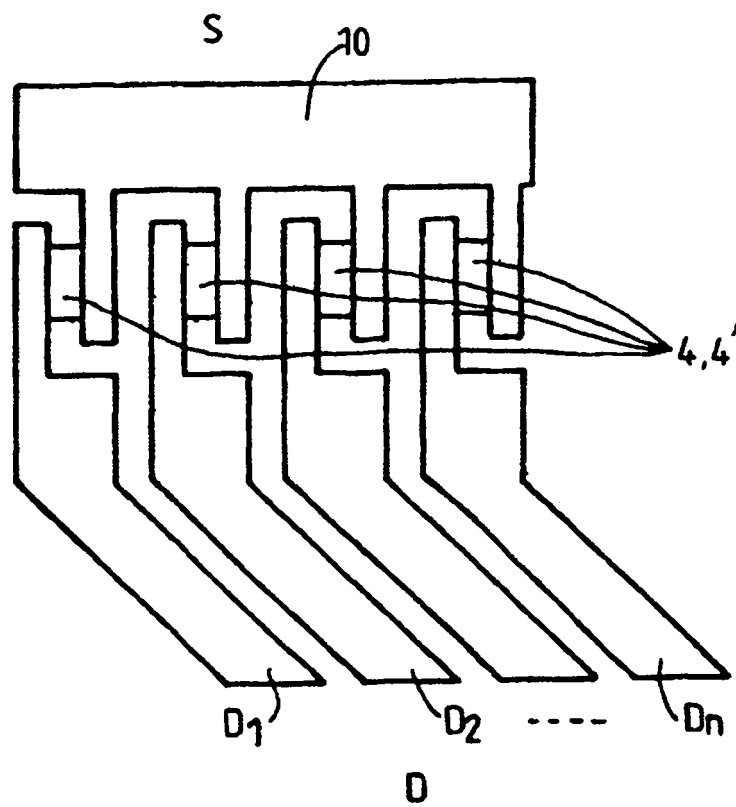


FIG. 2

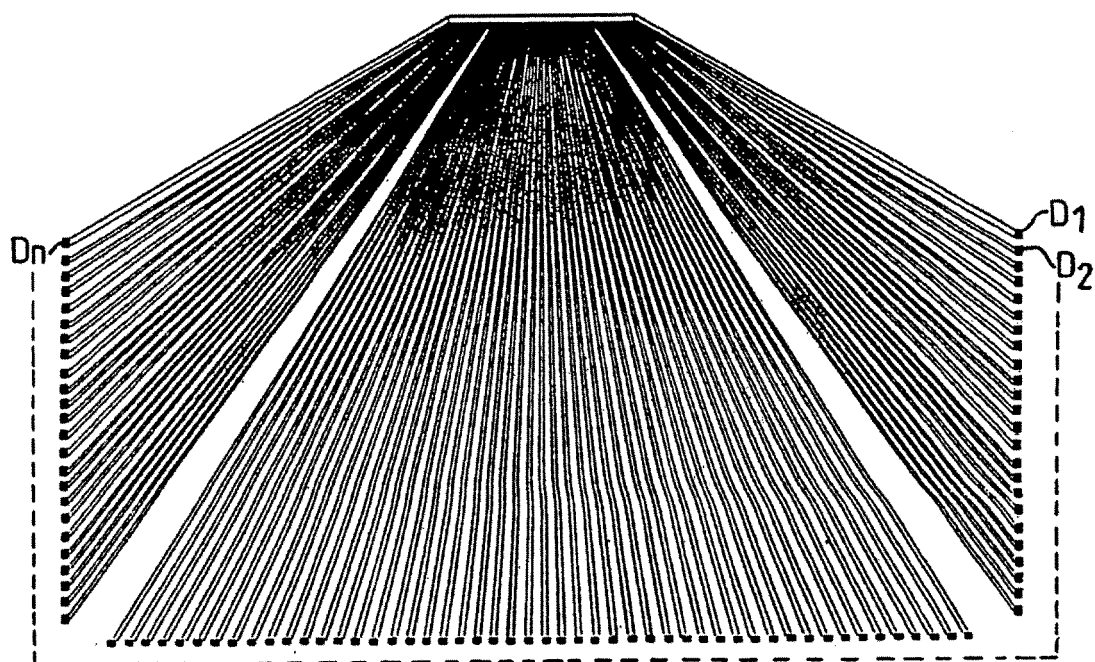
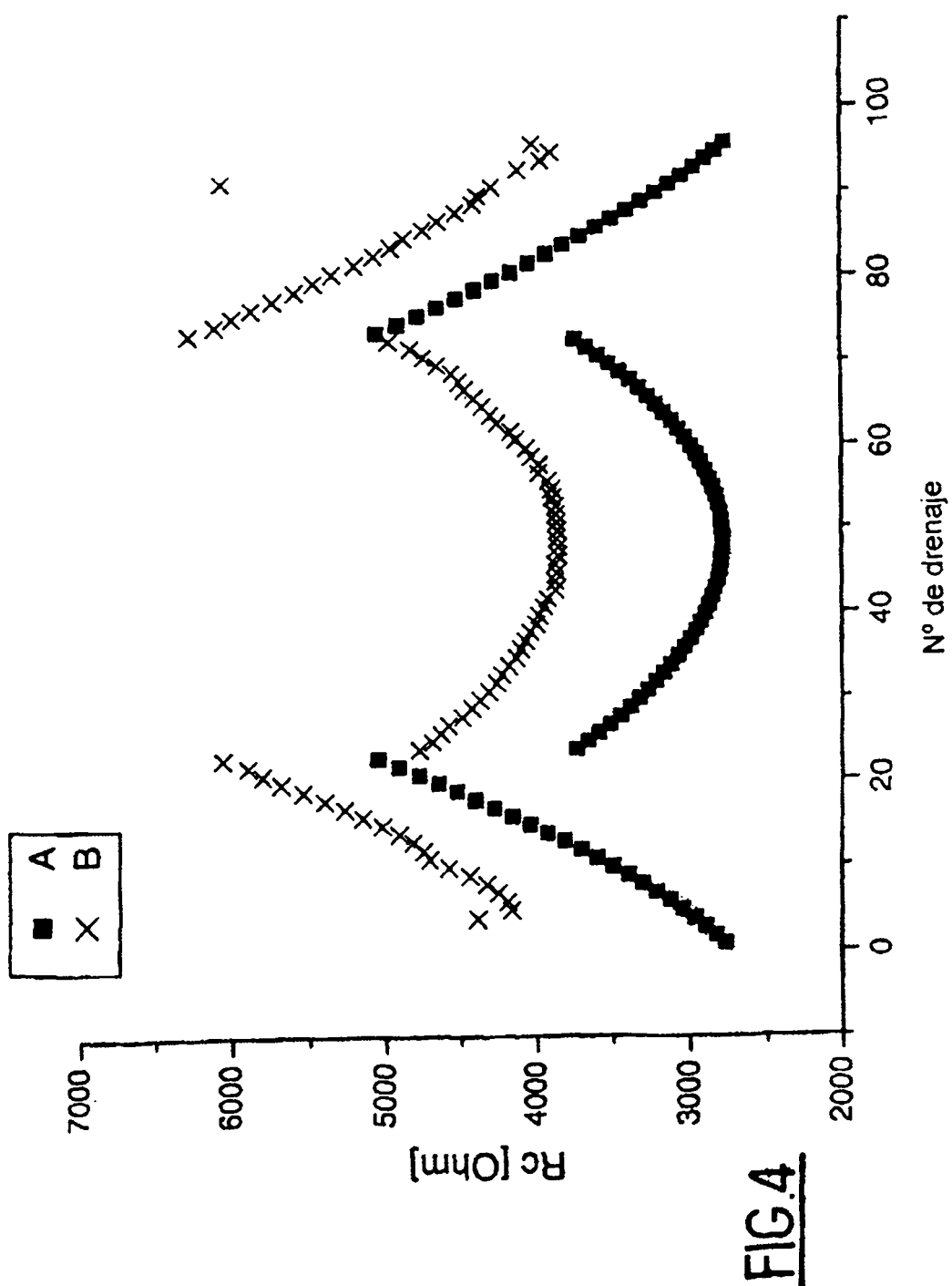
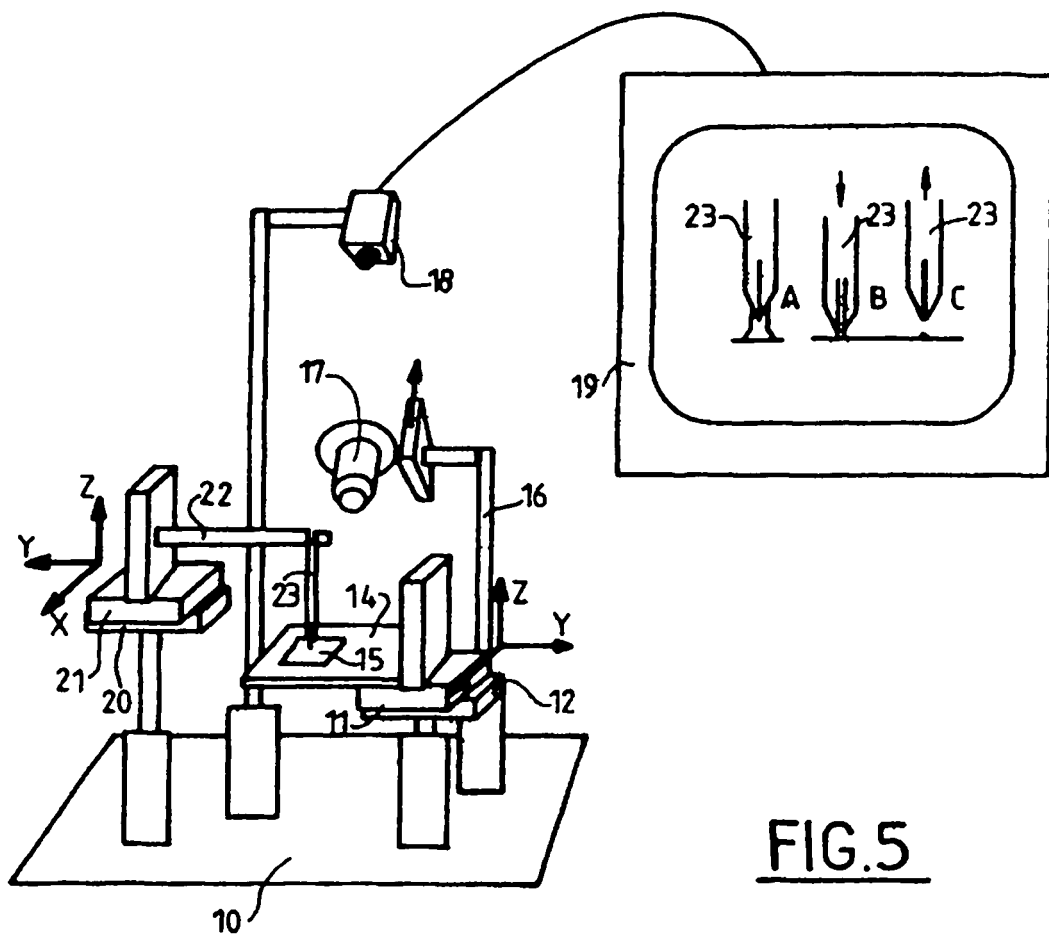
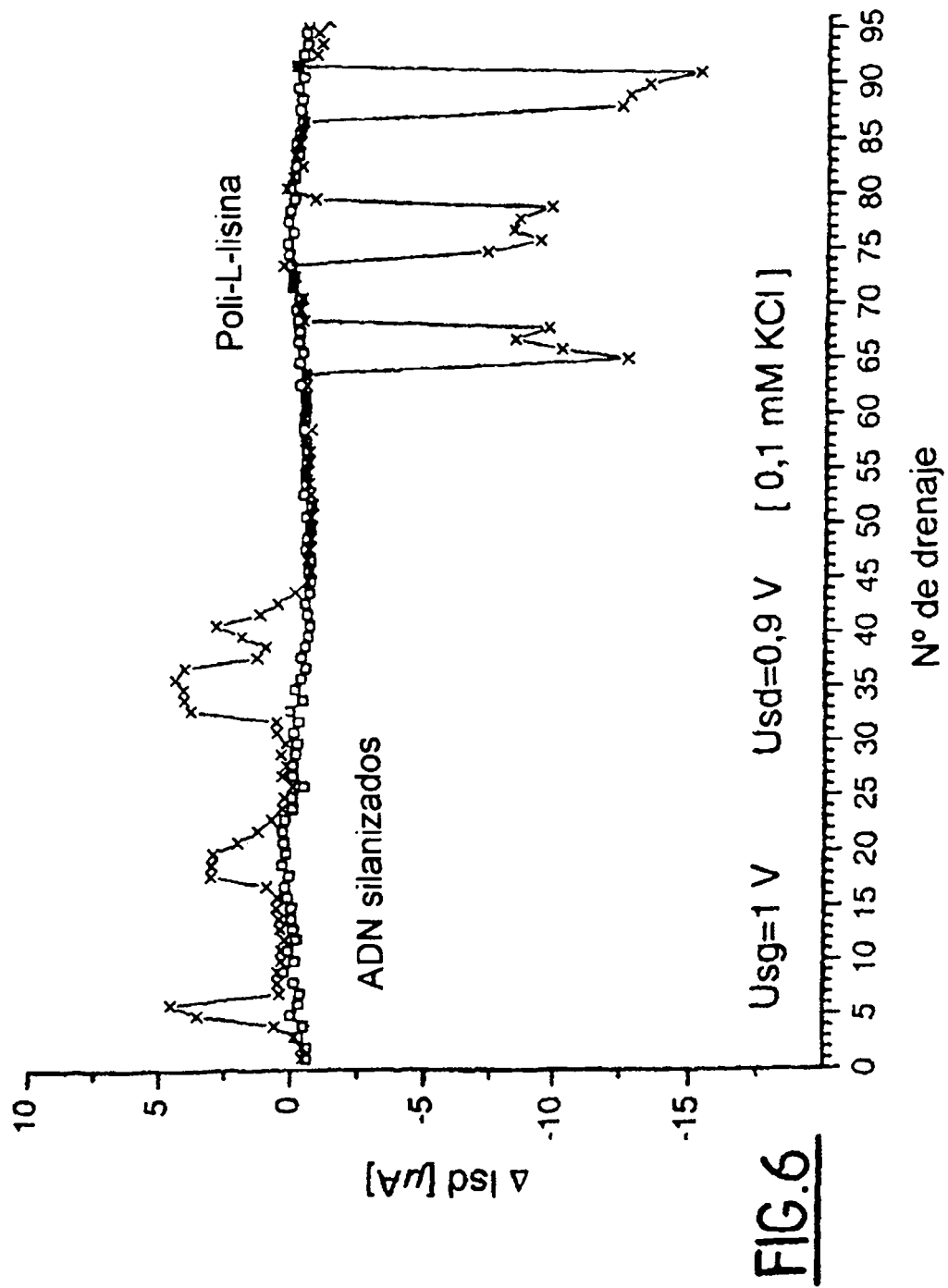


FIG. 3







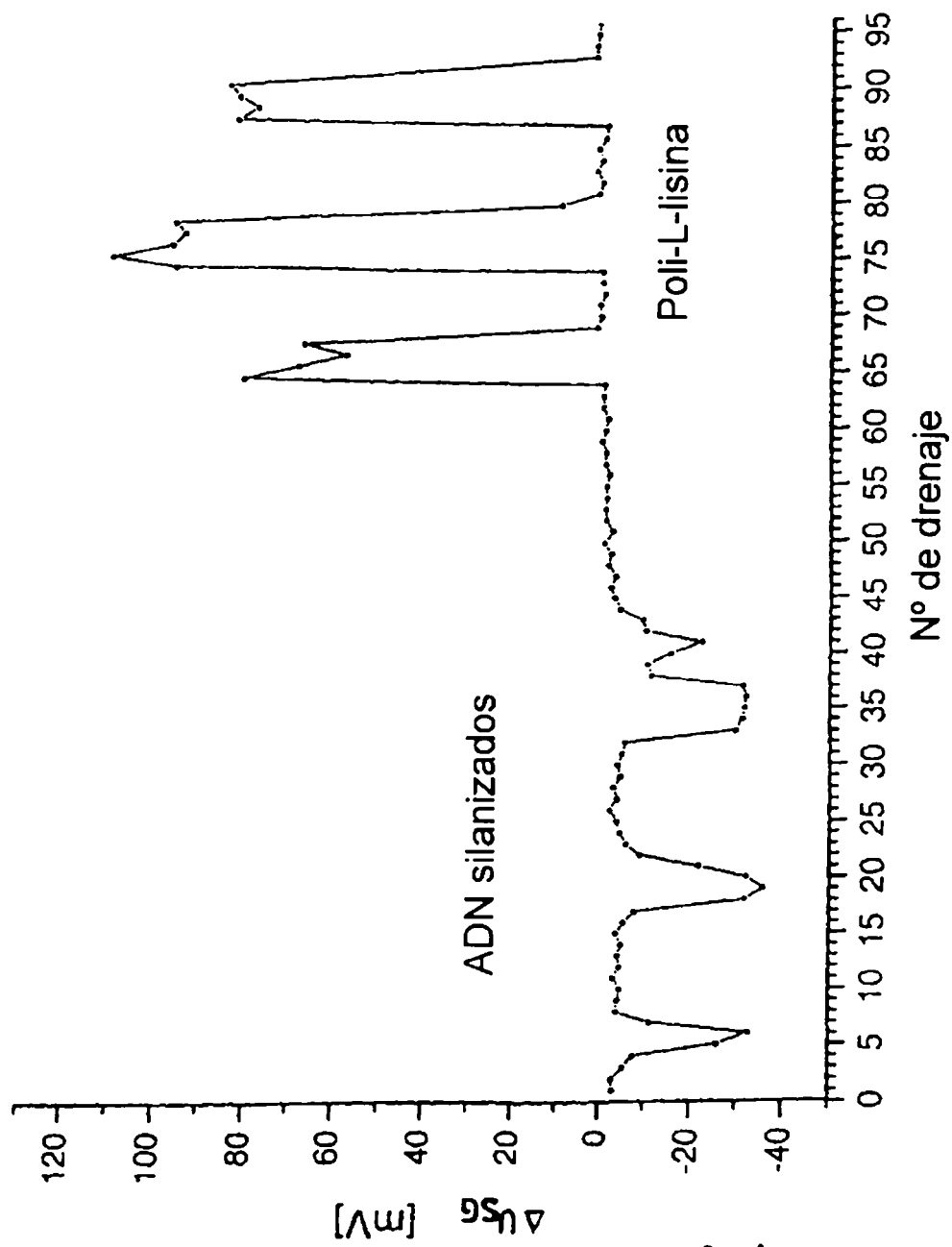


FIG.7

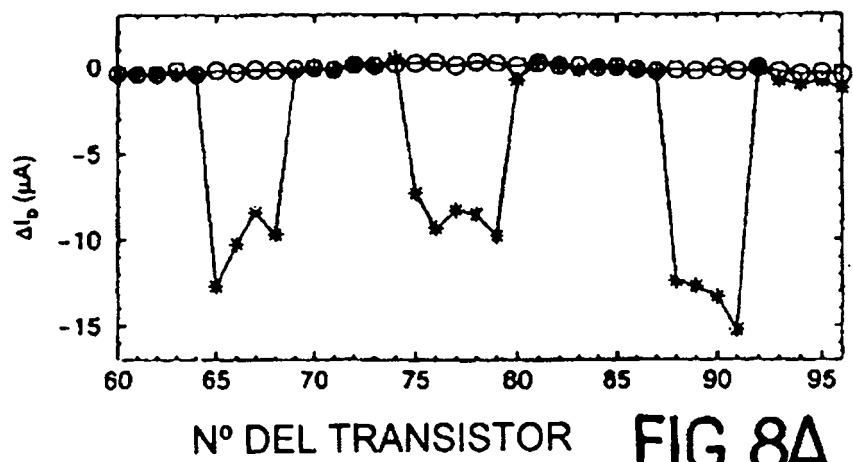


FIG. 8A

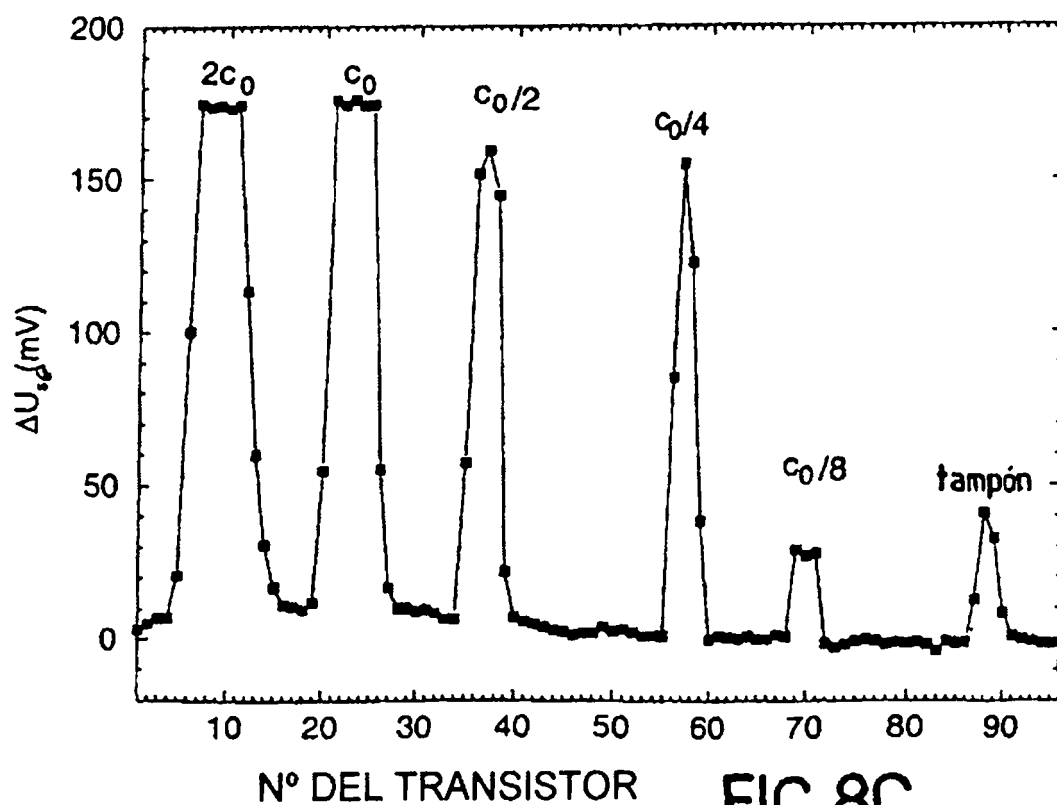


FIG. 8C

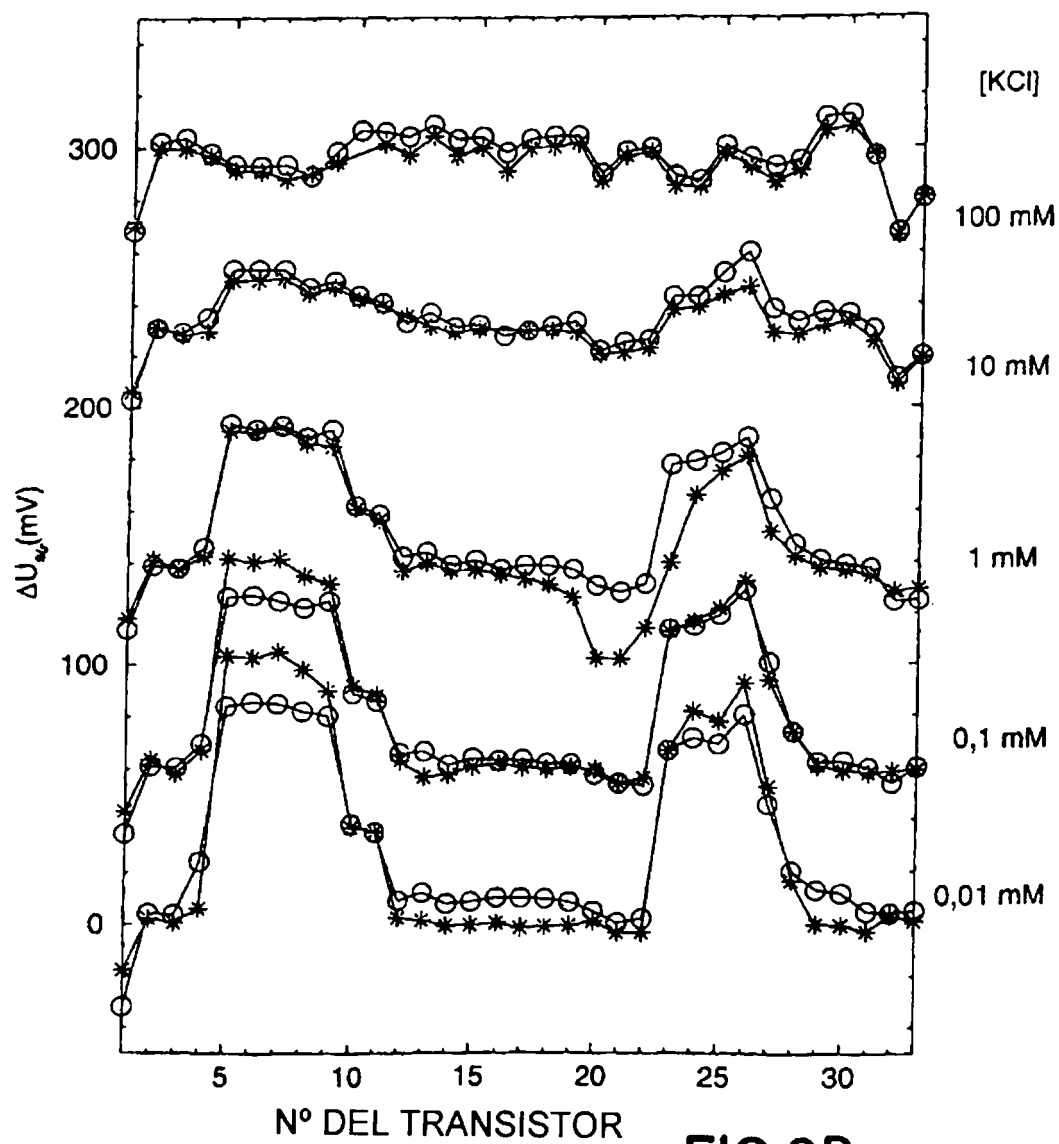
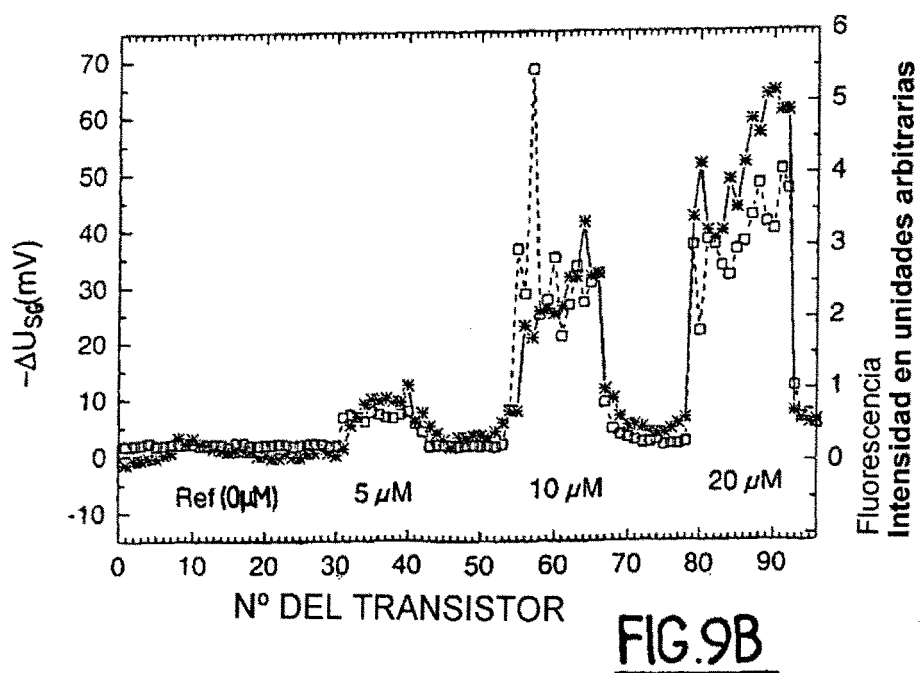
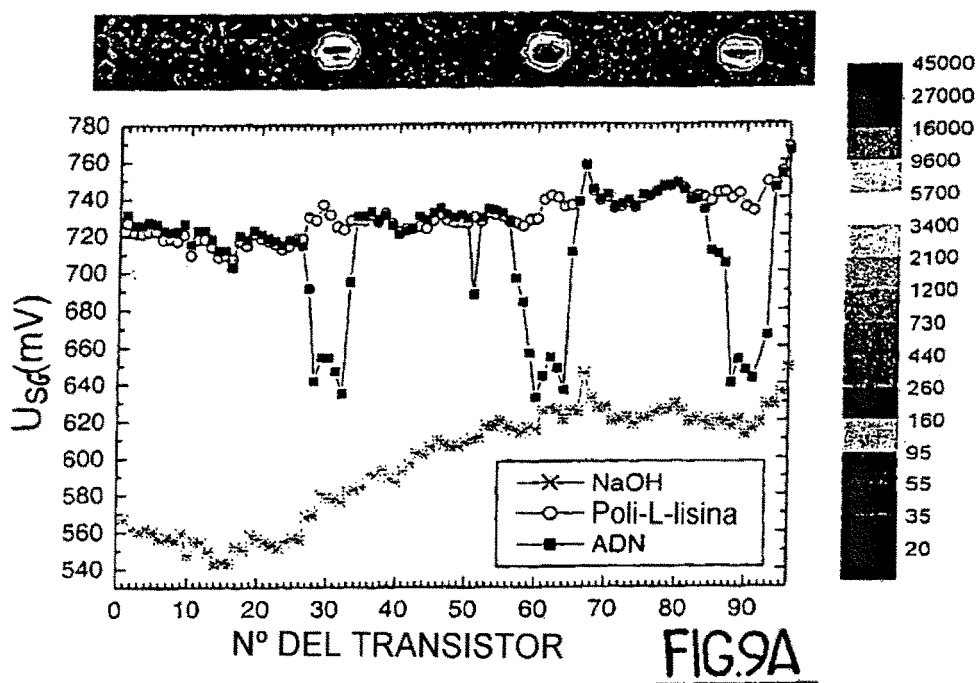


FIG.8B



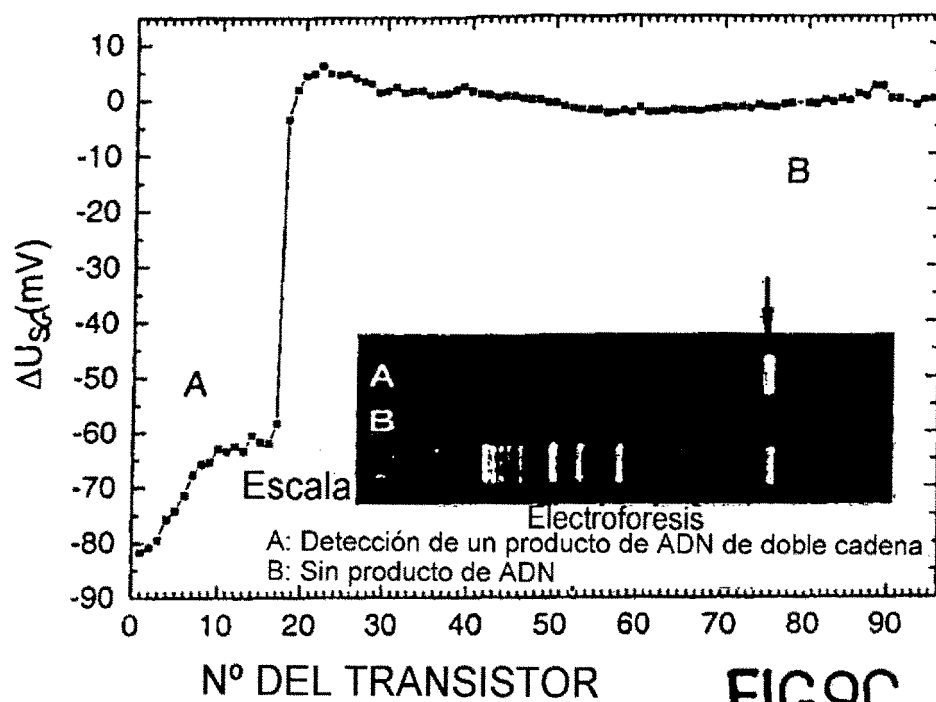


FIG.9C

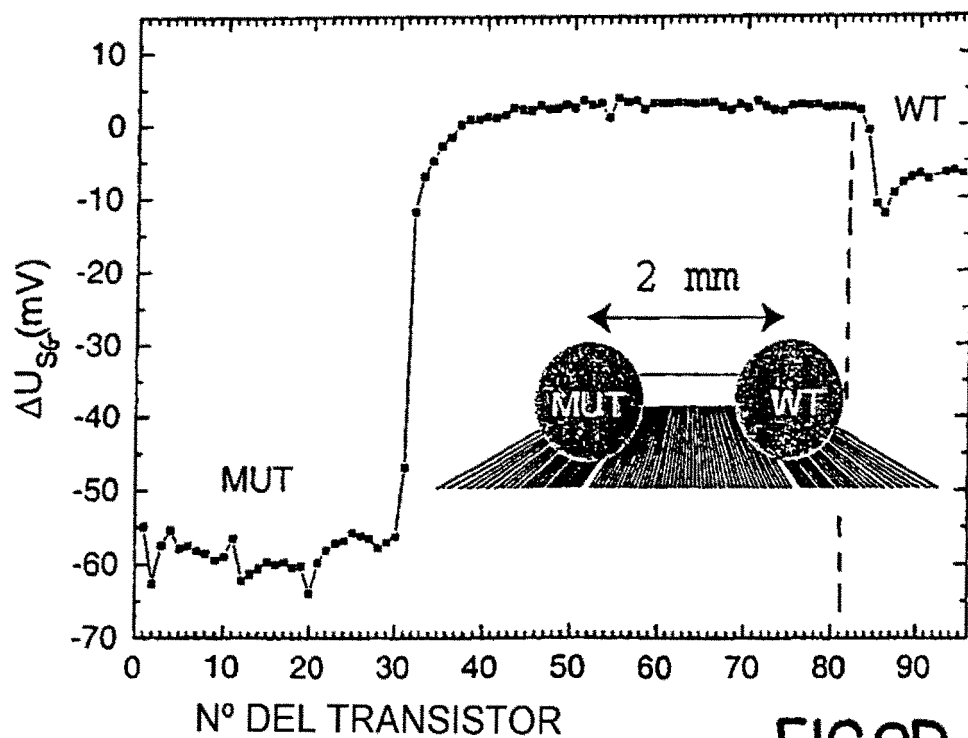


FIG.9D

