



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 269 054**

51 Int. Cl.:
B03C 5/00 (2006.01)
B03C 5/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **00121135 .8**
86 Fecha de presentación : **28.09.2000**
87 Número de publicación de la solicitud: **1088592**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **04.04.2001**

54 Título: **Método para separar sustancias usando fuerzas dielectroforéticas.**

30 Prioridad: **30.09.1999 JP 11-279912**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.04.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.04.2007

73 Titular/es:
WAKO PURE CHEMICAL INDUSTRIES, Ltd.
1-2 Doshomachi-3-chome
Chuo-ku, Osaka, JP

72 Inventor/es: **Washizu, Masao y**
Kawabata, Tomohisa

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 269 054 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para separar sustancias usando fuerzas dielectroforéticas.

5 Antecedentes de la invención**Campo de la invención**

La presente invención se refiere a métodos para separar dos o más tipos de moléculas usando fuerzas dielectroforéticas.

Antecedentes de la invención

Recientemente, el avance en la tecnología de los semiconductores ha establecido una tecnología de tratamiento de materiales a escala de nanómetros a micrómetros por medio de una tecnología de micromaquinarias como fotolitografía, que contenía avanzando también en la actualidad.

En los campos de la química y la bioquímica, una nueva tecnología denominada un Sistema de Microanálisis Total (μ -TAS) en laboratorio, en el que una pastilla está creciendo, en el que esta tecnología de micromaquinaria es empleada para llevar a cabo una serie completa de etapas analíticas químicas/biológicas de extracción de componente(s) que van a ser analizados de muestra biológicas (etapa de extracción), análisis del (o de los) componente(s) con reacción(es) química(s)/biológica(s) (etapa de análisis) y posterior separación (etapa de separación) y detección (etapa de detección) usando un dispositivo analítico altamente pequeño integrado en una pastilla, en que cada lado tiene una longitud de unos pocos centímetros a unas pocas decenas de centímetros.

Los procedimientos del μ -TAS se espera que supongan una gran contribución a reducir el tiempo de análisis, reduciendo las cantidades de muestras que van a ser usadas y los reactivos para las reacciones químicas/biológicas, y reducir el tamaño de los instrumentos analíticos y el espacio para el análisis en el transcurso de todas las etapas analíticas químicas/bioquímicas.

Para la etapa de preparación en μ -TAS, en particular, se han desarrollado métodos electroforéticos capilares en los que un capilar (tubo fino) con un diámetro interno de menos de 1 mm que está hecho de Teflon, sílice o similares como material, es usado como la columna separadora para conseguir la separación con diferencias de cargas de sustancias bajo un campo eléctrico elevado, y métodos cromatográficos de columna de capilaridad en los que un capilar similar es usado para conseguir la separación con la diferencia de interacción entre el vehículo en el medio de la columna y las sustancias.

Sin embargo, los métodos electroforéticos necesitan un alto voltaje para la separación y tienen un problema de una baja sensibilidad de detección debido al volumen capilar limitado en el área de detección y también en estos se encuentra el problema de que no son adecuados para la separación de sustancias de peso molecular elevado, aunque son adecuados para la separación de sustancias de bajo peso molecular, ya que la longitud del capilar para la separación está limitada en la pastilla capilar en una pastilla y, por tanto, no se puede preparar un capilar en una longitud suficiente para separar sustancias de peso molecular elevado. Además, en los métodos cromatográficos de columnas capilares, hay un límite en la preparación de la producción del tratamiento de separación mayor y también es un problema que es difícil reducir el tratamiento.

Por tanto, un medio de resolver los problemas anteriormente descritos ha sido indicado ahora mediante métodos de separación que utilizan un fenómeno en el que la colocación de sustancias bajo un campo eléctrico no uniforme da lugar a una polarización positiva y negativa en las sustancias, proporcionando así una fuerza conductora para desplazar las sustancias, denominada fuerza dielectroforética [H. A. Pohl, "Dielectrophoresis", Cambridge Univ. Press (1978); T. B. Jones, "Electromechanics of Particles", Cambridge Univ. Press (1995) y similares].

Estos métodos de separación se cree actualmente que son actualmente el método de separación más adecuado en μ -TAS desde los siguientes puntos de vista: (1) puede ser esperada una separación rápida a un bajo voltaje aplicado sin requerir un voltaje elevado como el de la electroforesis capilar, ya que un campo eléctrico y su gradiente pueden ser aumentados hasta un alcance extremo y son empleados los electrodos tratados con micromaquinaria, porque el grado de fuerzas dielectroforéticas depende del tamaño y las propiedades dieléctricas de las sustancias (partículas) y es proporcional al gradiente del campo eléctrico; (2) puede ser minimizado un aumento de la temperatura debido a la aplicación del campo eléctrico, y se puede formar un campo eléctrico elevado, ya que un área de un campo eléctrico fuerte está localizada en una zona significativamente pequeña; (3) como la fuerza dielectroforética es una fuerza proporcional al gradiente del campo eléctrico, la fuerza se entiende que es independiente de la polaridad del voltaje aplicado, y por tanto funciona bajo un campo eléctrico AC de una manera similar a un campo eléctrico D.C. y, por lo tanto, si se emplea una A.C. de frecuencia elevada, puede ser suprimida una reacción de electrodos (reacción electrolítica) en una solución acuosa, de forma que los propios electrodos puedan estar integrados en el canal (trayectoria de flujo de la muestra); (4) puede ser esperada una mejora en la sensibilidad de una detección, ya que no hay ninguna restricción para el volumen de la cámara del componente de detección como en la electroforesis de capilar, y similares.

Como métodos de separación que utilizan fuerzas dielectroforéticas como se describieron anteriormente, se han descrito diversos métodos hasta ahora [M. Washizu *et al.*, Conf. Rec. The Institute of Electrostastics Japan, '93 Ann. Meet. (Int. Session), pag. 27-32 (1993); Y. Huang *et al.*, Biophys. J., vol 73, pag. 1118-1129 (1997) y N. G. Green *et al.*, J. Phys. D: Appl. Phys. vol 31, 25-30 (1998) y similares].

Por ejemplo, la publicación Journal of Physics D, British Journal of Applied Physics (J. Phys. D: Appl. Phys.), 27, 2659-2662 (1994) describe que a partir de suspensiones que contienen células HL-60 y células sanguíneas normales, pudieron ser separadas las células respectivas; Microbiology, 140, 585-591 (1994) describe que a partir de suspensiones que contienen diferentes microorganismos, los microorganismos pueden ser separados en diferentes especies de levaduras y bacterias unos de otros; Journal of Biotechnology, 32, 29-37 (1994) describe que a partir de suspensiones que contienen células vivas y muertas de levadura, pueden ser separadas las dos células una de otra; y J. Phys. D: Appl. Phys., 31, 25-30 (1998) describe que a partir de suspensiones que contienen partículas de látex que tienen un diámetro de 93 nm y 216 nm, pueden ser separadas una de otra las dos partículas por dielectroforesis y fuerzas de electrofluidos.

Adicionalmente, M. Washizu *et al.*, IEEE Transaction IA, vol 30, nº 4, pag. 835-843 (1994) informaron que el uso de soluciones que contienen un único componente biológico como muestras, en que el componente es, por ejemplo, avidina (68 kDa), concanavalina A (52 kDa), quimotripsinógeno A (25 kD) o ribonucleasa A (13,7 kDa) es capturado en el electrodo por fuerzas dielectroforéticas, y también usando soluciones que contienen un único componente biológico como muestras, el componente puede ser capturado en el electrodo por fuerzas dielectroforéticas [la relación de captura fue de 100% cuando se usó una muestra de DNA de 48,5 kb solo, aproximadamente 60% cuando se usó una muestra de DNA 15 kb solo, y poco % usando una muestra de avidina (68 kDa solo)].

Sin embargo, los informes sobre métodos de separación con fuerzas electroforéticas convencionales como se describió anteriormente están limitados a separar partículas que tienen una baja solubilidad en una solución, relativos a DNA y proteínas, como diversas células y partículas de látex, o por lo demás solamente capturando un único (un tipo de) DNA o proteína, y ningún informe ha sido presentado todavía sobre la separación de moléculas respectivas a partir de soluciones en las que están disueltos dos o más tipos de moléculas de componentes biológicos, en particular, por ejemplo, DNA y proteínas.

Esto es porque dos tipos o más de moléculas como proteínas y DNA, que tienen un tamaño físico muy pequeño, en comparación con las células y las partículas de látex, se considera que son difíciles de separar uno de otro de la solución en que esas moléculas están disueltas sobre la base de la diferencia entre el tamaño de las respectivas moléculas usando fuerzas dielectroforéticas, ya que la resistencia de las fuerzas dielectroforéticas depende del tamaño físico de las sustancias, por lo que las sustancias que tienen un volumen mayor recibirán una mayor fuerza dielectroforética, y también porque la separación convencional se ha llevado a cabo a una débil resistencia del campo eléctrico inferior a 500 KV/m, por lo que la separación no se puede conseguir.

Sumario de la invención

El documento EP-A-0.815.942 describe un método de separación según el preámbulo de la reivindicación 1.

Es un objeto de la presente invención proporcionar un método para separar dos o más tipos de moléculas unos de otros usando fuerzas dielectroforéticas. Estos objetivos se consiguen con un método según la reivindicación 1.

Es también un objeto de la presente invención proporcionar un método para separar unos de otros dos o más tipos de moléculas disueltas en una solución, usando fuerzas dielectroforéticas, separación que había sido hasta ahora imposible.

Además de ello, es un objeto de la presente invención proporcionar un método capaz de separar rápida y fácilmente las moléculas respectivas a partir de una solución en la que están disueltos dos o más tipos de moléculas, por ejemplo, moléculas de componentes biológicos como DNA y proteínas, separación que había sido imposible por fuerzas dielectroforéticas.

La presente invención se lleva a cabo con el fin de resolver los problemas anteriormente mencionados y, por primera vez, ha conseguido la separación satisfactoria de dos o más tipos de moléculas, separación que había sido imposible hasta ahora usando fuerzas dielectroforéticas por medio de dos tipos de métodos descritos con posterioridad.

El primer método comprende formar una sustancia compleja de una "molécula específica" en una muestra y una "sustancia capaz de cambiar las propiedades dielectroforéticas de la "molécula específica" que se une a la "molécula específica" contenida en la misma" y separar así la sustancia compleja y las moléculas distintas de las moléculas específicas en la muestra unas de otras. En los métodos de separación conocidos hasta ahora con fuerzas dielectroforéticas, la separación no ha sido facilitada en absoluto formando esta sustancia compleja, y esta idea no ha sido reconocida en absoluto en el pasado.

El segundo método comprende colocar una solución en el que dos o más tipos de moléculas, en particular, por ejemplo, moléculas de componentes biológicos como DNA y proteínas, son disueltas bajo un campo dieléctrico fuerte, es decir, un campo eléctrico no uniforme que tiene una resistencia del campo eléctrico de 50 KV/m o mayor. Es un

ES 2 269 054 T3

nuevo descubrimiento desconocido hasta la fecha que las moléculas respectivas puedan ser separadas unas de otras mediante este método.

5 Por lo tanto, la presente invención se refiere a (1)(a) un método para separar una sustancia compleja de una “molécula específica” en una muestra y una “sustancia capaz de cambiar las propiedades dielectroforéticas de la molécula específica” que se une a la “molécula específica” a partir de moléculas distintas de la “molécula específica” en la muestra, que comprende formar la sustancia compleja de la “molécula específica” y la “sustancia capaz de cambiar las propiedades dielectroforéticas de la molécula específica”, y aplicar la mezcla de reacción resultante que contiene la sustancia compleja a la dielectroforesis, y separar la sustancia compleja de las moléculas distintas de la “molécula específica”; y

10 (a) un método para medir la “molécula específica” en la sustancia compleja separada o una molécula distinta de la “molécula específica” en la muestra; y

15 (b) un método para separar una sustancia compleja de una “molécula específica” en una muestra, una “sustancia que se une a la molécula específica” y una “sustancia capaz de cambiar las propiedades dielectroforéticas de la molécula específica” que no está involucrada en la formación de la sustancia compleja, que comprende poner en contacto la muestra que contiene la “sustancia específica” con la “sustancia que se une a la molécula específica”, y la “sustancia capaz de cambiar las propiedades dielectroforéticas de la molécula específica” para formar la sustancia compleja, y aplicar la mezcla de reacción resultante que contiene la sustancia compleja para la dielectroforesis, y separar la sustancia compleja de la “sustancia que se une a la molécula específica” que no está involucrada en la formación de la sustancia compleja; y

25 (c) un método para determinar una cantidad de un componente en una muestra, que comprende poner en contacto una muestra que contiene una “molécula específica” con una “molécula específica marcada por una sustancia marcadora” y una “sustancia capaz de cambiar las propiedades dielectroforéticas de la molécula específica” que se une a la “molécula específica” para formar una sustancia compleja marcada de la “molécula específica marcada por la sustancia marcadora” que no está involucrada en la formación de la sustancia compleja, medir la “molécula específica marcadora” en la sustancia compleja marcada separada de la “molécula específica marcada por la sustancia marcadora” que no está involucrada en la formación de la sustancia compleja, y determinar una cantidad del componente en la muestra sobre la base del resultado de la medición; y

30 (d) un estuche de ensayo para medir un componente en una muestra para ser usada en los métodos (a) a (c), que comprende una “sustancia capaz de cambiar las propiedades dielectroforéticas de la molécula específica” en la muestra, que puede formar una sustancia compleja con la “molécula específica”.

35 Además, en la presente memoria descriptiva (2) se describe un método que no pertenece a la invención para separar dos o más tipos de moléculas unas de otras, que comprende colocar una solución en la que dos o más tipos de moléculas están disueltas bajo un campo eléctrico no uniforme que tiene una resistencia del campo eléctrico de 500 KV/m o mayor, formado por electrodos que tienen una estructura capaz de formar un campo eléctrico no uniforme.

Más específicamente, se describe un método para detectar una molécula que va a ser medida en una muestra, que comprende hacer reaccionar una muestra líquida, en la que está disuelta una “molécula que va a ser medida”, y una solución, en la que está disuelta una “sustancia que se une específicamente a la molécula que va a ser medida”, para obtener una solución en la que están disueltas una sustancia compleja de la “molécula que va a ser medida” y la “sustancia que se une específicamente a la molécula que va a ser medida”, y la “sustancia que se une específicamente a la molécula que va a ser medida” que no está involucrada en la reacción, colocando la solución bajo un campo eléctrico no uniforme que tiene una resistencia del campo eléctrico de 500 KV/m o mayor, en que el campo eléctrico está formado por electrodos que tienen una estructura capaz de formar un campo eléctrico horizontal y verticalmente no uniforme, que separa la sustancia compleja de la “sustancia que se une específicamente a la molécula que va a ser medida” que no está involucrada en la reacción, y medir la “sustancia que se une específicamente a la molécula que va a ser medida” en la sustancia compleja, o la “sustancia que se une específicamente a la molécula que va a ser medida” que no está involucrada en la reacción; y un método para medir una sustancia que va a ser medida en una muestra, que comprende hacer reaccionar una muestra líquida que contiene una “molécula que va a ser medida”, una “molécula que va a ser medida marcada por una sustancia marcadora” y una “sustancia que se une específicamente a la molécula que va a ser medida”, para obtener una solución que contiene una sustancia compleja de la “molécula que va a ser medida marcada por una sustancia marcadora” y la “sustancia que se une específicamente a la molécula que va a ser medida”, una sustancia compleja de la “molécula que va a ser medida” y la “sustancia que se une específicamente a la molécula que va a ser medida”, y la “molécula que va a ser medida marcada por una sustancia marcadora” que no está involucrada en la reacción, colocando la solución obtenida bajo un campo eléctrico no uniforme que tiene una resistencia del campo eléctrico de 500 KV/m o mayor, en que el campo está formado por electrodos que tienen una estructura capaz de formar un campo eléctrico horizontal y verticalmente no uniforme, separar la sustancia compleja de la “molécula que va a ser medida marcada por una sustancia marcadora” y la “sustancia que se une específicamente a la molécula que va a ser medida” de la “molécula que va a ser medida marcada por una sustancia marcadora” que no está involucrada en la formación del complejo, y seguidamente medir la “molécula que va a ser medida marcada por una sustancia marcadora” en la sustancia compleja de la “molécula que va a ser medida marcada por una sustancia marcadora” que no está involucrada en la formación de la sustancia compleja, para determinar la cantidad de la molécula que va a ser medida en la muestra, basándose en los resultados.

Los objetos y ventajas anteriores y otros de la invención resultarán más evidentes a partir de la siguiente descripción.

Breve descripción de los dibujos

- 5 La Figura 1 es una representación que muestra el principio de la dielectroforesis.
- La Figura 2 es una representación que muestra ejemplos específicos de electrodos usados en la presente invención.
- 10 La Figura 3 es una representación que muestra una realización de sustratos de electrodos que tienen la trayectoria de flujo usada en la presente invención.
- La Figura 4 es una vista esquemática del sustrato de electrodo de dielectroforesis elaborado en el Ejemplo de Referencia 1.
- 15 La Figura 5 es una vista esquemática del electrodo elaborado en el Ejemplo de Referencia 1.
- La Figura 6 es una vista esquemática del sustrato de electrodo que tiene la trayectoria de flujo elaborado en el Ejemplo de Referencia 2.
- 20 La Figura 7 es una vista esquemática de la sección a lo largo de la línea a-a' de la Figura 6.
- La Figura 8 es un gráfico que muestra la relación entre concentraciones de biotina y relaciones de captura obtenidas en el Ejemplo 1.
- 25 La Figura 9 son imágenes fluorescentes en el electrodo obtenido en el Ejemplo 2, tomadas por microscopio láser antes y durante la aplicación de un campo eléctrico.
- La Figura 10 es un gráfico que muestra la relación entre concentraciones de AFP en suero y concentraciones en análisis de imágenes obtenidas en el Ejemplo 2.
- 30 La Figura 11 es un gráfico que muestra la relación entre concentraciones de AFP en suero y concentraciones de análisis de imágenes obtenidas en el Ejemplo 2.
- La Figura 12 es una vista esquemática del electrodo antes y durante la aplicación de un campo eléctrico y fotografías de microscopio de fluorescencia durante la aplicación de un campo eléctrico obtenido en el Ejemplo 3.
- 35 La Figura 13 es un gráfico que muestra los cambios a lo largo del tiempo de la cantidad de fluorescencia a la salida de la trayectoria de flujo obtenida usando una solución de λ -DNA marcada en el Ejemplo Experimental 2.
- 40 La Figura 14 es un gráfico que muestra los cambios a lo largo del tiempo de la cantidad de fluorescencia a la salida de la trayectoria de flujo obtenida usando una solución de oligonucleótido marcado en el Ejemplo Experimental 2.
- La Figura 15 es un gráfico que muestra la relación entre las resistencias del campo eléctrico y las relaciones de captura de un λ -DNA marcado obtenido en el Ejemplo 4.
- 45 La Figura 16 es un gráfico que muestra la relación entre las resistencias del campo eléctrico y las relaciones de captura de una IgM marcada o una BSA marcada obtenidas en el Ejemplo 5.
- 50 La Figura 17 es un gráfico que muestra la relación entre λ -DNA marcado con biotina y las relaciones de captura obtenidas en el Ejemplo 6.

Descripción detallada de la realización preferida

- 55 Las realizaciones de la presente invención se describirán como sigue.
- Las fuerzas de dielectroforesis son fuerzas que resultan del fenómeno descrito a continuación.
- A saber, como se muestra en la Figura 1, una molécula neutra colocada en un campo eléctrico tiene una carga de polarización positivamente inducida +q en dirección descendente del campo eléctrico y una carga de polarización negativamente inducida -q en dirección ascendente del campo eléctrico, respectivamente, por lo que +q recibe una fuerza +qE del campo eléctrico E y esta parte es arrastrada en dirección descendente en el campo eléctrico, mientras que -q recibe una fuerza -qE del campo eléctrico E y esta parte es arrastrada en dirección ascendente en el campo eléctrico. Si la molécula es neutra, +q y -q tienen un valor absoluto igual, y si el campo eléctrico es uniforme independientemente de las posiciones, ambas reciben fuerzas que están equilibradas y, por lo tanto, la molécula no se desplaza. Sin embargo, en el caso en que el campo eléctrico sea no uniforme como se muestra en la Figura 1, una fuerza atractiva hacia un campo eléctrico fuerte se hace más ancha, por tanto la molécula es conducida hacia el lado fuerte del campo eléctrico. Este fenómeno en el que las moléculas neutras se desplazan bajo un campo eléctrico no uniforme es denominado die-
- 60
- 65

lectroforesis (DEP), y la fuerza recibida por las moléculas durante ese tiempo se denomina fuerza dielectroforética. Si las moléculas son con carga, el modo de desplazamiento es como uno que comprende fuerzas electroforéticas además de fuerzas dielectroforéticas.

5 Las muestras a las que puede ser aplicada la presente invención incluyen muestras derivadas de un cuerpo vivo como fluidos corporales que incluyen suero, plasma, fluido cerebroespinal, fluido sinovial, linfático, etc. excreciones que incluyen orina, heces, etc. y sus materiales tratados. Los materiales tratados incluyen soluciones diluidas de estas muestras derivadas de un cuerpo vivo en agua, tampones o similares, o los reconstituidos disolviendo o poniendo en suspensión apropiadamente moléculas como se describe con posterioridad a partir de estas muestras derivadas del
10 cuerpo en agua, tampones o similares. Las muestras a las que se aplica la presente invención incluyen también las que contienen las moléculas anteriormente descritas que están químicamente sintetizadas.

El primer método según la presente invención (abreviados a veces en lo sucesivo como realización (1)), se refiere a un método para separar una molécula específica esta muestra como en lo que antecede a partir de otras moléculas co-
15 existentes y, adicionalmente, determinar la molécula separada, y un estuche de ensayo para ser usado en este método.

Estas realizaciones de la presente invención abarcan: (a) una caracterizada por formar una sustancia compleja de una “molécula específica en una muestra” y una “sustancia capaz de cambiar las propiedades dielectroforéticas de la molécula específica” que se une a la “molécula específica”, (b) una caracterizada por formar una sustancia compleja formada por una “molécula específica en una muestra”, una “sustancia que se une a una molécula específica” y una
20 “sustancia capaz de cambiar propiedades dielectroforéticas de la molécula específica” que se une a la “molécula específica”, y (c) una caracterizada por formar una sustancia compleja en una “molécula específica” en una muestra o una “molécula específica marcada por una sustancia marcadora” y “sustancia capaz de cambiar las propiedades dielectroforéticas de la molécula específica” que se une a la “molécula específica”, y similares.

En cada una de estas realizaciones, una “molécula específica” incluye una molécula destinada a medir (también denominada una molécula que va a ser medida) y una molécula distinta de una molécula destinada a medir (también denominada una molécula que no va a ser medida).

30 Moléculas específicas (moléculas que van a ser medidas) incluyen, por ejemplo, cadenas de nucleótidos (cadenas de oligonucleótidos o cadenas de polinucleótidos), cromosomas, cadenas de péptidos (por ejemplo, C-péptido, angiotensina I y similares), proteínas (por ejemplo, proteínas de suero como inmunoglobulina A (IgA), inmunoglobulina E (IgE), inmunoglobulina G (IgG), β_2 -microglobulina, albúmina y ferritina; proteínas de enzimas como amilasa, fosfatasa alcalina y γ -glutamyltransferasa; anticuerpos antivirales para virus como Rubella virus, Herpes virus, Hepatitis virus, ATL virus y virus del SIDA y sustancias antígenas derivadas de estos virus; anticuerpos para diversos alérgenos; lípidos como lipoproteínas; y proteasas como tripsina, plasmina y serina), cadenas de azúcares (por ejemplo, cadenas de azúcares de α -fetoproteína, CA19-9, antígeno específico de la próstata, antígeno carcinoembrionario, sustancias que tienen cadenas de azúcares particulares producidos por células cancerígenas), lecitinas (por ejemplo, concanavalina A, lecitina de *Lens culinaris*, lecitina de *Phaseolus vulgaris*, lecitina de *Datura stramonium*, lecitina de germen de trigo)
40 y similares.

Adicionalmente, las moléculas específicas (moléculas que van a ser medidas) incluyen también moléculas que existen como dos o más tipos de sustancias que tienen la misma función o moléculas que existen como dos o más tipos de sustancias que tienen una estructura similar pero que tienen una función diferente como isozimas y hormonas, por ejemplo, enzimas como amilasa, fosfatasa alcalina, fosfatasa ácida, γ -glutamyltransferasa (γ -GTP), lipasa, creatina quinasa (CK), lactato deshidrogenasa (LDH), transaminasa glutámica-oxaloacética (GOT), transaminasa glutámica-pirúvica (GPT), renina, proteína quinasa, tirosina quinasa; sustancias fisiológicamente activas como hormonas esteroides, gonadotropina coriónica humana (hCG), prolactina, hormona estimuladora del tiroides (TSH), hormona luteinizante (LH); antígenos asociados al cáncer como antígeno específico de la próstata (PSA), α^2 -macroglubulina, antígeno carcinoembrionario (CEA), α -fetoproteína y similares.

Una “sustancia capaz de cambiar propiedades dielectroforéticas” en la presente invención (también denominada una sustancia mejoradora de la separación) incluye una sustancia que, uniéndose a una molécula específica, provoca diferencias de comportamiento del funcionamiento dielectroforético entre la molécula específica y las demás sustancias co-existentes (moléculas que no van a ser medidas, por ejemplo, uno o más tipos de sustancias que no estén involucradas en la formación del complejo): por ejemplo 1) una sustancia que pueda provocar como resultado que una cualquiera de las dos sea capturada en el electrodo de dielectroforesis y las demás no sean capturadas, y más específicamente una sustancia que pueda proporcionar cambios en la velocidad de movimiento de la molécula específica y las demás sustancias co-existentes, por ejemplo, en el caso de emplear un aparato denominado de cromatografía dielectroforética (aparato de fraccionamiento del flujo de campo) en el que la separación se lleva a cabo como se describe a continuación con la interacción entre fuerzas dielectroforéticas provocadas por las moléculas en el campo eléctrico y el movimiento molecular y, más preferentemente, una sustancia mediante la cual una cualquiera de estas pueda ser capturada en el electrodo y las demás se puedan hacer pasar a través del electrodo de dielectroforesis sin ser capturadas en el electrodo; o 2) una sustancia que pueda provocar un resultado que una cualquiera de las dos reciba fuerzas dielectroforéticas negativas y las demás reciban fuerzas dielectroforéticas positivas y, más específicamente, una sustancia que, por ejemplo, pueda permitir que solamente la molécula específica se una en una posición particular en el electrodo dielectroforético y, más preferentemente, una sustancia que pueda permitir que una cualquiera de estas se una un una zona de fuerte resistencia del campo eléctrico en el electrodo de dielectroforesis por fuerzas
65

dielectroforéticas positivas y las otras se unan en una zona de débil resistencia del campo eléctrico en el electrodo de dielectroforesis por fuerzas dielectroforéticas negativas; o similares.

Estas sustancias incluyen óxidos de metales inorgánicos como sílice y alúmina; metales como oro, titanio, hierro y níquel; óxidos de metales inorgánicos y similares que tienen grupos funcionales introducidos mediante un procedimiento de acoplamiento de silano y similares; seres vivos como diversos microorganismos y células eucarióticas; polisacáridos como agarosa, celulosa, dextrano insoluble; compuestos macromoleculares sintéticos como látex de poliestireno, copolímero de estireno-butadieno, copolímero de estireno-metacrilato, copolímero de acroleína-dimetacrilato de etilenglicol, látex de estireno-sulfonato de estireno, poli(acrilamida, poli(metacrilato de glicidilo), partículas revestidas con poli(acroleína, poli(acrilonitrilo reticulado, compuesto acrílico o copolímero de éster acrílico, acrilonitrilo-butadieno, cloruro de vinilo-éster acrílico y poli(acetato-acrilato de vinilo); moléculas biológicas como eritrocitos, azúcares, ácidos nucleicos, proteínas y lípidos, y similares.

Estas sustancias son usadas habitualmente en la forma de partículas finas a gránulos.

Una “sustancia que se une a una molécula específica” que puede ser usada en la presente invención, puede no estar limitada en particular e incluye una sustancia que, desde una “molécula específica” en una muestra, puede formar una sustancia compleja de la “molécula específica”, una “sustancia que se une a la molécula específica” y una “sustancia específica capaz de cambiar propiedades dielectroforéticas”, y no forma sustancialmente una sustancia compleja de “moléculas distintas de la molécula específica”, la “sustancia que se une a la molécula específica” y la “sustancia específica capaz de cambiar propiedades dielectroforéticas”. Brevemente, en la medida en que la sustancia no forme la última sustancia compleja de las sustancias anteriormente mencionadas, puede ser usada para estos fines incluso si se une a moléculas distintas de la “molécula específica”. Realmente, es usada preferentemente una “sustancia que se une específicamente a la molécula específica.

Una “sustancia que se une a una molécula específica” se refiere a una sustancia que se une a unas “moléculas específicas” por reacciones mutuas como una reacción de “antígeno”-“anticuerpo” y “proteína”-“cadena de péptido”, una reacción de “cromosoma o cadena de nucleótido”-“cadena de nucleótido”. Si un miembro es una molécula específica (molécula que va a ser medida) en cada combinación anteriormente descrita, la otra es una “sustancia que se une a una molécula específica (molécula que va a ser medida)” como se describió anteriormente. Por ejemplo, si una molécula específica (molécula que va a ser medida) es un “antígeno”, una “sustancia que se une a la molécula específica (molécula que va a ser medida)” es un “anticuerpo”, y si una molécula específica (molécula que va a ser medida) es un “anticuerpo”, una “sustancia que se une a la molécula específica (molécula que va a ser medida)” es un “antígeno” (otras combinaciones anteriormente descritas tienen una relación similar).

Es adecuado que la “sustancia que se une a la molécula específica (molécula que va a ser medida)” se una al menos a la “molécula específica” y no se una de forma necesariamente específica solamente a la molécula específica. Sin embargo, en el caso de que una “sustancia que se une a la molécula específica (molécula que va a ser medida)” no sea una sustancia que no se una específicamente a la molécula específica, la “sustancia capaz de cambiar propiedades dielectroforéticas de la molécula específica” que va a ser usada en la combinación es generalmente una que se une específicamente a la “molécula específica”, o una que tiene propiedades de unirse específicamente a un nuevo sitio formado mediante la formación de una sustancia compleja de la “molécula específica” y la “sustancia que se une a la molécula específica (molécula que va a ser medida)”.

Esta “sustancia que se une a la molécula específica (molécula que va a ser medida)” es generalmente una que puede ser medida (detectada) o marcada por una sustancia marcadora mediante algún método. El uso de una sustancia que tiene esta propiedad hará posible medir (detectar) una molécula específica (molécula que va a ser medida) en una muestra. En el caso de que una molécula específica (molécula que va a ser medida) en sí misma pueda ser detectada mediante algún método (por ejemplo, una enzima o similar), o cuando una molécula específica (molécula que va a ser medida) puede unirse directamente a una sustancia marcadora sin (a través de) una “sustancia que se une a la molécula específica”, la molécula específica (molécula que va a ser medida) en una muestra puede ser medida (detectada) incluso si la “sustancia que se une a la molécula específica” no posee esta propiedad anteriormente descrita, o la “sustancia que se une a la molécula específica” no es empleada. Ejemplos de las que pueden ser detectadas en sí mismas por algún método son enzimas, colorantes, sustancias fluorescentes, sustancias luminiscentes, sustancias que tienen absorción en el campo ultravioleta y similares.

Las sustancias marcadoras que pueden ser usadas en la presente invención son cualquiera de las sustancias habitualmente usadas en la técnica, que incluyen inmunoensayo enzimático (EIA), radioinmunoensayo (RIA, fluoroinmunoensayo (FIA), hibridación y similares, y están ilustrados por enzimas como fosfatasa alcalina (ALP), β -galactosidasa (β -Gal), peroxidasa (POD), micropoxidasa, glucosa oxidasa (TOE), glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), malato deshidrogenasa y luciferasa; colorantes como Coomassie Brilliant Blue R250 y metil orange; radioisótopos como $\text{Tc}^{99\text{m}}$, I^{131} , I^{125} , C^{14} , H^3 , P^{32} y S^{35} ; sustancias fluorescentes como fluoresceína, rodamina, dansilo, fluorescamina, cumarina, naftilamina o sus derivados y europio (Eu); sustancias luminiscentes como luciferina, isoluminol, luminol y bis(2,4,6-trifluorofenil)oxalato; sustancias que tienen absorción en el campo ultravioleta con fenol, naftol, antraceno y sus derivados; sustancias que tienen propiedades como agentes marcadores del espín ilustradas por compuestos con grupos oxilo como 4-amino-2,2,6,6-tetrametilpiperidino-1-oxilo, 3-amino-2,2,5,5-tetrametilpiperidina-1-oxilo y 2,6-di-t- α -(3,5-di-t-butil-4-oxo-2,5-ciclohexadien-1-ilideno)-p-toliloxilo y similares. El marcado de una molécula específica (molécula que va a ser marcada) o una “sustancia que se une a la molécula específica” por una sustancia

5 marcadora se puede realizar mediante uno cualquiera de los métodos habituales comúnmente usados en la técnica, como los métodos de marcado conocidos que SE emplean comúnmente en EIA, RIA, FIA, hibridación o similares, que con conocidos por sí mismos [por ejemplo Ikagaku Zikken Kosa (Methods in Medical and Chemical Experiments) vol. 8, editado por Y. Yamamura, 1ª ed., Nakayama-Shoten, 1971; A. Kawao, "Illustrative Fluorescent Antibodies", 1ª ed. Softscience Inc., 1983; "Enzyme Immunoassay", editado por E. Ishikawa, T. Kawai y K. Mihay, 3ª ed., Igaku-Shoin, 1987; "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2ª ed. J. Sambrook, E. F. Fritsch y T. Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, y similares] y métodos habituales que emplean una reacción de avidina (o estreptavidina) y biotina.

10 En la realización (a) anteriormente mencionada, con el fin de formar una sustancia compleja de una "molécula específica en una muestra" y una "sustancia capaz de cambiar propiedades dielectroforéticas de la molécula específica", una muestra que contiene una "molécula específica" y una "sustancia capaz de cambiar propiedades dielectroforéticas de la molécula específica" son disueltas, dispersadas o puestas en suspensión, respectivamente, por ejemplo, en agua o tampones como tampones de tris(hidroximetilaminometano), tampones de Good, tampones de fosfato, tampones de borato y similares para proporcionar materiales líquidos, y los materiales líquidos son mezclados y puestos en contacto unos con otros. Estas muestras y sustancias pueden ser disueltas, dispersadas o puestas en suspensión de una vez. En el caso en que una muestra que contiene una "molécula específica" sea líquida, una "sustancia capaz de cambiar propiedades dielectroforéticas de la molécula específica" puede ser directamente mezclada con la muestra.

20 La formación de un complejo en las realizaciones (b) y (c) anteriormente mencionadas de la presente invención se puede realizar también de una forma similar, como se describió anteriormente.

25 En la realización (b) anteriormente mencionada, con el fin de formar unas sustancias complejas de una "molécula específica en una muestra", una "sustancia que se une a la molécula específica" y una "sustancia capaz de cambiar propiedades dielectroforéticas de la molécula específica", una muestra que contiene una "molécula específica", una "sustancia que se une a la molécula específica" y una "sustancia capaz de cambiar propiedades dielectroforéticas de la molécula específica" pueden ser disueltas, dispersadas o puestas en suspensión, respectivamente, por ejemplo, en agua o tampones como tampones de tris(hidroximetilaminometano), tampones de Good, tampones de fosfato, tampones de borato y similares, para proporcionar materiales líquidos, y los materiales líquidos son mezclados y puestos en contacto unos con otros. Estas muestras y sustancias pueden ser disueltas, dispersadas o puestas en suspensión de una vez. Alternativamente, una sustancia compleja de una "sustancia que se une a la molécula específica" y una "sustancia capaz de cambiar propiedades dielectroforéticas de la molécula específica" se forma en primer lugar de una manera similar a la anteriormente descrita, y seguidamente un material líquido que contiene la sustancia compleja es adicionalmente mezclado y puesto en contacto con un material líquido de una muestra que contiene una molécula específica preparada como se describió previamente. Alternativamente, una muestra que contiene una "molécula específica" y una "sustancia capaz de cambiar propiedades dielectroforéticas de la molécula específica" es puesta en contacto una con otra para formar una sustancia compleja de estas y la resultante se pone seguidamente en contacto con una "sustancia que se une a la molécula específica".

40 Si una muestra que contiene una "molécula específica" es líquida, puede no ser disuelta, dispersada o puesta en suspensión, por ejemplo, en agua o tampones, como se describió anteriormente.

45 En la realización (c) anteriormente mencionada, con el fin de formar una sustancia compleja de una "molécula específica en una muestra" o una "molécula específica marcada por una sustancia marcadora" y una "sustancia capaz de cambiar propiedades dielectroforéticas de la molécula específica", una muestra que contiene una "molécula específica", una "molécula específica marcada por una sustancia marcadora" puede ser disuelta, dispersada o puesta en suspensión, respectivamente, por ejemplo, en agua o tampones como tris(hidroximetilaminometano), tampones de Good, tampones de fosfato, tampones de borato y similares, para proporcionar materiales líquidos, y estos materiales líquidos pueden ser mezclados y puestos en contacto unos con otros. El material líquido mixto puede ser mezclado y puesto en contacto con un material líquido obtenido disolviendo, dispersando o poniendo en suspensión una "sustancia que se une a la molécula específica", por ejemplo, en agua o tampones como tampones de tris(hidroximetilaminometano), tampones de Good, tampones de fosfato, tampones de borato y similares. Alternativamente, esas muestras y sustancias pueden ser disueltas, dispersadas o puestas en suspensión de una vez.

55 Si una muestra que contiene una "molécula específica" es líquida, como se describió anteriormente, puede ser disuelta, dispersada o puesta en suspensión, por ejemplo, en agua o tampones como tris(hidroximetilaminometano) y tampones de Good.

60 El complejo que contiene material líquido así obtenido es seguidamente sometido a dielectroforesis.

Ecuación general de fuerzas dielectroforéticas

65 El método del momento dipolar equivalente es un procedimiento para analizar fuerzas dielectroforéticas sustituyendo un dipolo eléctrico equivalente con cargas inducidas. Según este método, la fuerza dielectroforética F_d que recibe una partícula esférica con un radio a es colocada en un campo eléctrico E esta dada por:

ES 2 269 054 T3

$$F_d = 2\pi a^3 \varepsilon_m \operatorname{Re}[K^*(\omega)] \nabla(E_2) \quad (1)$$

5 en la que $K^*(\omega)$ es expresado usando la frecuencia angular de voltaje ω aplicado y la unidad imaginaria J como sigue:

$$K^*(\omega) = \varepsilon^* - \varepsilon_m^* / \varepsilon_p^* + 2\varepsilon_m^* \quad (2)$$

$$10 \quad \varepsilon_p^* = \varepsilon_p - j\sigma_p / \omega, \quad \varepsilon_m^* = \varepsilon_m - j\sigma_m / \omega \quad (3)$$

15 en que ε_p , ε_m , σ_p y σ_m son permitividad y conductividad de la partícula y la solución, y las cantidades complejas son indicadas mediante *.

15 La ecuación (1) indica que si $\operatorname{Re}[K^*(\omega)] > 0$, la fuerza actúa de forma que el campo eléctrico atrae a la partícula hacia un lado fuerte (dielectroforética positiva, DEP positiva) y si $\operatorname{Re}[K^*(\omega)] < 0$, la fuerza actúa de forma que el campo eléctrico arrastra a la partícula hacia un lado débil (dielectroforética negativa, DEP negativa).

20 Puede entenderse a partir de la ecuación general anteriormente mencionada de fuerzas dielectroforéticas que los parámetros involucrados en las fuerzas dielectroforéticas de sustancias que reciben fuerzas dielectroforéticas son, en general, la permitividad y la conductividad de las sustancias y el medio, el tamaño de las sustancias y la frecuencia del campo eléctrico aplicado. Estos parámetros deben ser ajustados apropiadamente, dependiendo del tipo de separación que mejora las sustancias a las que se ha unido una sustancia compleja detectora y las sustancias marcadoras que se usan para la detección de la molécula específica (molécula que va a ser medida). Aunque no puede ser mencionado en general, la conductividad del medio empleado es habitualmente no más de 13 mS/cm (como concentración de PBS) y preferentemente no más de 1 mS/cm. Para el tamaño de las sustancias mejoradoras de la separación, en el caso de partículas, un tamaño de partículas medio es habitualmente no más de 1 mm, y preferentemente 0,025 a 100 μm , y en el caso de moléculas biológicas, el tamaño es habitualmente más de 10 nm, y preferentemente más de 50 nm (tamaños de formas estimados de moléculas de proteínas normales de unos pocos a algunas decenas de nanómetros).

Campo eléctrico usado para separación dielectroforética empleando sustancias mejoradoras de la separación

35 Se puede decir a partir de la ecuación general anteriormente mencionada de dielectroforesis que los parámetros involucrados en las fuerzas dielectroforéticas de un campo eléctrico aplicado son la resistencia del campo eléctrico aplicado y la frecuencia aplicada. En particular, incluso si las sustancias son iguales, como la frecuencia aplicada puede provocar cambios en las propiedades dielectroforéticas positivas y negativas, los parámetros han de ser ajustados apropiadamente según la molécula específica (molécula que va a ser medida). Estos parámetros deben ser ajustados apropiadamente dependiendo del tipo de sustancias mejoradoras de la separación a las que una sustancia compleja detectora se ha unido y las sustancias marcadoras que se usan para la detección de la molécula específica (molécula que va a ser medida). Aunque no puede ser mencionado en general, si una sustancia mejoradora de la separación de dielectroforesis tiene una dielectroforesis positiva, la resistencia del campo eléctrico aplicado es habitualmente no más de 3,5 MV/m, y preferentemente no más de 1,0 MV/m. Si una sustancia mejoradora de la separación de dielectroforesis tiene una dielectroforesis negativa, la resistencia del campo eléctrico es de no más de 3,5 MV/m. La frecuencia aplicada está habitualmente en el sector de 100 Hz a 10 MHz, y preferentemente 1 kHz a 10 MHz.

45 En la presente invención, el campo eléctrico que va a ser aplicado puede ser cualquiera de un campo eléctrico AC y un campo eléctrico DC, y es generalmente preferible usar el campo eléctrico AC.

Método de separación con sustancias mejoradoras de la separación de dielectroforesis

Los métodos de separación de una molécula específica empleando sustancias mejoradoras de la separación pueden ser clasificados en dos tipos como se describe a continuación:

55 Método de separación 1

60 En primer lugar, en el caso de que una sustancia mejoradora de la separación sea una sustancia que tenga las mismas fuerzas dielectroforéticas positivas o negativas como moléculas distintas de la molécula específica (molécula que va a ser medida) [por ejemplo, una sustancia marcadora libre (por ejemplo, una sustancia específica marcada por una sustancia marcadora que no está involucrada en una sustancia compleja) empleada para la detección de la molécula específica y similares] y esté influenciada por fuerzas dielectroforéticas mayores que la molécula específica (molécula que va a ser medida), sustancialmente, solamente la sustancia mejoradora de la separación y la molécula específica unida a la sustancia mejoradora de la separación recibieron fuerzas dielectroforéticas grandes y se separaron.

65 Es decir, (1) por ejemplo, la molécula específica puede ser separada de las moléculas distintas de la molécula específica ajustando la resistencia del campo eléctrico y las condiciones medias de forma que la sustancia mejoradora de la separación y una molécula unida a la sustancia mejoradora de la separación se unan en una posición particular en el electrodo de dielectroforesis por fuerzas dielectroforéticas, y las moléculas distintas de la molécula específica

(molécula que no va a ser medida) [por ejemplo, una sustancia marcadora libre empleada para la detección de la molécula específica y similares] no se unan.

Adicionalmente, (2) por ejemplo, la separación se puede llevar a cabo empleando un aparato de cromatografía denominado dielectroforético (aparato de fraccionamiento del flujo de campo) en el que la separación se lleva a cabo con la interacción entre las fuerzas dielectroforéticas provocadas sobre las moléculas a partir del campo eléctrico como se describe con posterioridad y el movimiento molecular. En este caso, como la sustancia mejoradora de la separación y la molécula unida a la sustancia mejoradora de la separación solamente son capturadas en el electrodo de separación de dielectroforesis por fuerzas dielectroforéticas, o como las diferencias tienen lugar entre la velocidad de desplazamiento de la sustancia mejoradora y la molécula unida a la sustancia mejoradora de la separación por una parte, y la de las demás moléculas por otra parte, la molécula específica puede ser fácilmente separada de las moléculas distintas de la molécula específica (moléculas que no va a ser medidas).

Método de separación 2

En segundo lugar, en el caso de que la sustancia mejoradora de la separación sea una sustancia que tenga fuerzas dielectroforéticas positivas o negativas diferentes de las moléculas distintas de la molécula específica [por ejemplo, una sustancia marcadora para ser usada en la detección de la molécula específica], es decir, cuando una sustancia mejoradora de la separación tiene fuerzas dielectroforéticas positivas y las moléculas distintas de la molécula específica tiene fuerzas dielectroforéticas negativas, o dicho de otra forma, una sustancia mejoradora de la separación tiene fuerzas dieléctricas negativas y las moléculas distintas de la molécula específica tienen fuerzas dielectroforéticas positivas, la sustancia mejoradora de la separación y la molécula específica unida a la sustancia mejoradora de la separación por un lado, y las moléculas distintas de la molécula específica por otro lado se desplazan a zonas de campos eléctricos diferentes y, por tanto, la molécula específica puede ser separada de las moléculas distintas de las moléculas específicas.

Es decir, por ejemplo (1) la sustancia mejoradora de la separación y la molécula unida a la sustancia mejoradora de la separación por un lado, y las moléculas distintas de la molécula específica por otro lado se desplazan a zonas de campos eléctricos sustancialmente diferentes, respectivamente en el electrodo de dielectroforesis por fuerzas dielectroforéticas, de forma que la molécula específica puede ser separada de las moléculas distintas de la molécula específica [por ejemplo, una sustancia marcadora para ser usada en la detección de la molécula específica y similares].

Adicionalmente (2) la separación se puede realizar, por ejemplo, usando un aparato de cromatografía dielectroforética (aparato de fraccionamiento del flujo de campo). En este caso, bajo condiciones en las que la sustancia mejoradora de la separación y la molécula específica unida a la sustancia mejoradora de la separación tengan fuerzas dielectroforéticas positivas, y las moléculas distintas de la molécula específica tengan fuerzas dielectroforéticas negativas, la sustancia mejoradora de la separación y la molécula específica unida a la sustancia mejoradora de la separación son capturadas en el electrodo de separación dielectroforético por fuerzas dielectroforéticas, y las moléculas distintas de la molécula específica no son capturadas en el electrodo por fuerzas dielectroforéticas negativas. Por otra parte, bajo condiciones en las que las moléculas distintas de la molécula específica tengan fuerzas dielectroforéticas positivas, y la sustancia mejoradora de la separación y la molécula específica unida a la sustancia mejoradora de la separación tengan fuerzas dielectroforéticas negativas, las moléculas distintas de la molécula específica son capturadas en el electrodo de separación dielectroforética por fuerzas dielectroforéticas, y la sustancia mejoradora de la separación y la molécula específica unida a la sustancia mejoradora de la separación no son capturadas en el electrodo por fuerzas dielectroforéticas negativas. Por tanto, la molécula específica puede ser separada de las moléculas distintas de la molécula específica.

Para electrodos de dielectroforesis y aparatos de cromatografía dielectroforética que pueden ser empleados en la presente invención, pueden ser usados cualesquiera de los que se emplean habitualmente en la técnica. En particular, como se expone con posterioridad, están incluidos electrodos que tienen una estructura capaz de formar un campo eléctrico horizontal y verticalmente no uniforme equipados con el electrodo como es que se acaba de exponer.

Una “sustancia mejoradora de la separación” es habitualmente usada en la forma unida a una “sustancia de unión a la molécula específica”, con lo que la sustancia puede estar unida a la “molécula específica” en una muestra. Alternativamente, la unión directa de la “sustancia mejoradora de la separación” a la “molécula específica” se puede llevar a cabo mediante métodos químicos como métodos para unir a la molécula específica a través de un grupo funcional que sea previamente introducido en la superficie de la sustancia mejoradora de la separación, métodos para unir la “molécula específica” a la sustancia mejoradora de la separación a través de un conector, y similares. Para la “sustancia que se une específicamente a la molécula específica” empleada en este caso se puede usar la misma sustancia que la “sustancia que se une específicamente a la molécula específica” previamente descrita [no es necesario que esta en sí misma pueda ser medida (detectada) o marcada con una sustancia marcadora mediante algún método], o una sustancia que posea propiedades de unirse específicamente a un nuevo sitio formado mediante la formación de una sustancia compleja de la “molécula específica” y la “sustancia que se une a la molécula específica”, o similares. La sustancia que posee propiedades de unirse específicamente a un nuevo sitio formado mediante la formación de una sustancia compleja de la “molécula específica” y la “sustancia que se une a la molécula específica” incluye, por ejemplo, anticuerpos, cadenas de péptidos, cadenas de nucleótidos y similares, que pueden reconocer la sustancia compleja de la “molécula específica” y la “sustancia que se une a la molécula específica y se puede unir a la sustancia compleja”.

ES 2 269 054 T3

La unión de la “sustancia mejoradora de la separación” y la “sustancia que se une a la molécula específica” se puede llevar a cabo de un modo similar a los métodos para marcar la “molécula específica” con una sustancia marcadora, como se describió anteriormente.

5 Cuando una sustancia que posee específicamente propiedades de unirse de forma directamente a la “molécula específica” es usada como una “sustancia mejoradora de la separación”, no son necesarios los procedimientos anteriormente descritos.

10 Esta “sustancia mejoradora de la separación” incluye, por ejemplo, ácidos nucleicos, proteínas, lípidos y similares.

10 En la presente invención, “separar la sustancia compleja de las moléculas distintas de la ”molécula específica contenida en la muestra“ no significa necesariamente separar (aislar) solamente la ”sustancia compleja (por ejemplo, la sustancia compleja de la molécula específica y la sustancia mejoradora de la separación), sino que significa separar uno o más tipos de sustancias distintas de la “sustancia compleja” que coexiste en la muestra y la “molécula específica” una de otra, dependiendo de la finalidad. En este caso, si las condiciones son ajustadas de forma apropiada y se repite el método de separación según la presente invención, la “molécula específica” puede ser aislada en forma de una sustancia compleja de la misma con la sustancia mejoradora de la separación. En resumen, el objeto es hacer posible medir una cantidad de la “molécula específica” o las “moléculas distintas de la molécula específica” en una muestra.

20 Según el método de separación de la presente invención como se describió anteriormente, pueden ser recogidas la “molécula específica” (que incluye los casos de ser recogida en forma de una sustancia compleja de la molécula específica y una sustancia mejoradora de la separación) o las moléculas distintas de la “molécula específica”.

25 A saber, en el caso de (1) el Método de separación 1 anteriormente descrito, por ejemplo, las moléculas distintas de la “molécula específica” pueden ser recogidas lavando el electrodo con un tampón apropiado habitualmente empleado en la técnica, agua o similar, mientras se aplica un campo eléctrico con condiciones tales que la molécula específica sea capturada en forma de una sustancia compleja con una sustancia mejoradora de la separación en una posición particular del electrodo, y las demás moléculas no son capturadas en una posición particular en el electrodo, y seguidamente la molécula específica (una sustancia compleja de la molécula específica y la sustancia mejoradora de la separación) puede ser recogida cesando de aplicar el campo eléctrico y lavando el electrodo con un tampón apropiado habitualmente empleado en la técnica, agua o similar.

35 En el caso (1) del Método de separación 2 anteriormente descrito, la sustancia mejoradora de la separación y la molécula unida a la sustancia mejoradora de la separación por una parte, y las moléculas distintas de la molécula específica por otra parte, se desplazan a zonas del campo eléctrico sustancialmente diferentes, respectivamente, en el electrodo de dielectroforesis por fuerzas dielectroforéticas, de forma que estas moléculas en desplazamiento pueden ser recogidas de forma separada y respectiva.

40 En el caso en que la separación se lleve a cabo mediante el método (2) del Método de separación 1 anteriormente descrito, la molécula específica u otras moléculas pueden ser recogidas respectivamente recogiendo una primera fase móvil que contiene las moléculas distintas de la molécula específica que recibe pequeñas fuerzas dielectroforéticas y desplazándose sin ser capturada en una posición particular del electrodo y, después de eso, recogiendo una solución lavada que contiene la molécula específica desplazando la molécula específica que recibe grandes fuerzas dielectroforéticas que es capturada en una posición particular en el electrodo durante la aplicación del campo eléctrico, cesando de aplicar el campo eléctrico y lavando el electrodo con un tampón apropiado habitualmente empleado en la técnica, agua o similar.

50 En el caso de que la separación se lleve a cabo mediante el método (2) del Método de separación 2 anteriormente descrito, la molécula específica o la otra molécula pueden ser recogidas respectivamente, bajo condiciones en la que la sustancia mejoradora de la separación y la molécula específica unida a la sustancia mejoradora de la separación tengan fuerzas dielectroforéticas positivas y las moléculas distintas de la molécula específica tenga fuerzas dielectroforéticas negativas, recogiendo una primera fase móvil que contenga las moléculas distintas de la molécula específica que tiene fuerzas dielectroforéticas negativas y desplazándose sin ser capturada en una posición particular en el electrodo y, después de eso, recogiendo una solución lavada que contiene la molécula específica desplazando la molécula específica que tiene fuerzas dielectroforéticas positivas, que es capturada en una posición particular en el electrodo durante la aplicación del campo eléctrico, cesando de aplicar el campo eléctrico y lavando el electrodo con un tampón apropiado habitualmente empleado en la técnica, agua o similar. Alternativamente, la molécula específica o la otra molécula pueden ser recogidas respectivamente bajo condiciones en las que las moléculas distintas de la molécula específica tengan fuerzas dielectroforéticas positivas y la sustancia mejoradora de la separación y la molécula específica unida a la sustancia mejoradora de la separación tengan fuerzas dielectroforéticas negativas, recogiendo una primera fase móvil que contenga la molécula específica que tiene fuerzas dielectroforéticas negativas y desplazándose sin ser capturada en una posición particular del electrodo y, después de eso, recogiendo una solución lavada que contiene las moléculas distintas de la molécula específica desplazando las moléculas que tienen fuerzas dielectroforéticas positivas y que han sido capturadas en una posición particular del electrodo durante la aplicación del campo eléctrico cesando de aplicar el campo eléctrico y lavando el electrodo con un tampón apropiado habitualmente empleado en la técnica, agua o similar.

Los tampones que pueden ser empleados incluyen tampones que son habitualmente empleados en la técnica, por ejemplo, tampones de tris(hidroximetilaminometano), tampones de Good, tampones de fosfato, tampones de borato y similares.

5 Una sustancia compleja de los dos miembros anteriormente mencionados (la “molécula específica” y la “sustancia capaz de cambiar propiedades dielectroforéticas de las moléculas específicas”) no puede ser habitualmente separada de la “sustancia capaz de cambiar propiedades dielectroforéticas de las moléculas específicas” por dielectroforesis. Además, una sustancia compleja de los tres miembros anteriormente mencionados (la “molécula específica” y la “sustancia que se une a la molécula específica” y la “sustancia capaz de cambiar propiedades dielectroforéticas de las moléculas específicas”) no puede ser habitualmente separada de una sustancia compleja de la “sustancia que se une a la molécula específica” y la “sustancia capaz de cambiar propiedades dielectroforéticas de las moléculas específicas” y la “sustancia capaz de cambiar propiedades dielectroforéticas de las moléculas específicas” libre por dielectroforesis. Incluso si no se consigue la separación, sin embargo, no hay ningún problema particular en medir las “moléculas específicas” en una muestra, como se describe con posterioridad.

15 Cuando una “sustancia capaz de cambiar propiedades dielectroforéticas de las moléculas específicas” que se une a la “molécula específica” en una muestra es usada sola, no en forma de una sustancia compleja de la “sustancia capaz de cambiar propiedades dielectroforéticas de las moléculas específicas” y una “sustancia que se une a la molécula específica”, ya que si la “sustancia que se une a la molécula específica” es usada en una cantidad en exceso, la “sustancia que se une a la molécula específica” todavía permanece. Sin embargo, la sustancia así retenida que se une a la molécula específica puede ser separada junto con las moléculas distintas de “la molécula específica”.

20 Una segunda realización que no pertenece a la presente invención (un segundo método, abreviado a veces en lo sucesivo como realización (2)) se refiere a separar dos o más tipos de moléculas unas de otras colocando una solución en la que los dos o más tipos de moléculas están disueltas bajo un campo eléctrico no uniforme que tiene una resistencia del campo eléctrico de 500 KV/m o mayor, en que el campo está formado por un electrodo que tiene una estructura capaz de formar un campo eléctrico no uniforme.

25 Lo que sigue describe esto en detalle.

30 Una resistencia del campo eléctrico de 500 KV/m o mayor permite separar dos o más tipos de moléculas en una solución con otra que no ha sido separada en el pasado. Una resistencia del campo eléctrico adecuada para el campo eléctrico no uniforme formado por el electrodo que se describió anteriormente debe ser ajustada apropiadamente, dependiendo del tipo de los dos o más tipos de moléculas en una solución, y aunque esto no puede ser mencionado en general, se selecciona apropiadamente en el intervalo de 500 KV/m o mayor, preferentemente 500 KV/m o mayor a 35 10 MV/m, más preferentemente 500 KV/m a 3,5 MV/m. Resistencias superiores del campo eléctrico pueden provocar dificultades en el análisis debido a la generación de calor. Si son de esperar estas probabilidades, se puede realizar un enfriamiento apropiado de la unidad del electrodo, por ejemplo.

40 En la presente invención, el campo eléctrico que va a ser aplicado puede ser cualquiera de un campo eléctrico AC y un campo eléctrico DC, y generalmente es preferible usar el campo eléctrico AC.

Más específicamente, por ejemplo, si una molécula que va a ser medida es una cadena de nucleótidos (oligonucleótido o polinucleótido), cromosoma y similar, la resistencia del campo eléctrico es 500 KV/m o mayor, preferentemente 45 500 KV/m a 10 MV/m, más preferentemente 500 KV/m a 3,5 MV/m. Si una molécula que va a ser medida es, por ejemplo, una cadena de péptido, una proteína o similar, la resistencia del campo eléctrico es 500 KV/m o mayor, preferentemente 1 MV/m a 10 MV/m, más preferentemente 1 MV/m a 3,5 MV/m.

50 La frecuencia de los campos eléctricos no uniformes es habitualmente 100 HZ a 10 MHz y, más preferentemente 1 kHz a 10 MHz.

En el caso de la realización (1) de la presente invención, como la separación es facilitada debido a uso de una sustancia compleja que contiene una “sustancia capaz de cambiar propiedades dielectroforéticas de la molécula específica”, dos o más tipos de moléculas pueden ser separadas respectivamente a una resistencia del campo eléctrico inferior a 500 KV/m. Sin embargo, es preferible llevar a cabo la separación a 500 KV/m o más, porque la separación resultará más fácil.

Dos o más tipos de moléculas en la realización (2) incluyen componentes biológicos como cadenas de nucleótidos (cadenas de oligonucleótidos, cadenas de polinucleótidos), cromosomas, cadenas de péptidos (por ejemplo, C- 60 péptido, angiotensina I y similares), proteínas (proteínas de suero como inmunoglobulina A (IgA), inmunoglobulina E (IgE), inmunoglobulina G (IgG), β_2 -microglobulina, albúmina y ferritina; proteínas enzimáticas como amilasa, fosfatasa alcalina y γ -glutamyltransferasa; anticuerpos antivirales para virus como el virus Rubella, virus Herpes, virus de la hepatitis, virus ATL, virus del SIDA y sustancias antígenas de estos virus; anticuerpos para diversos alérgenos; lípidos como lipoproteínas; y proteasas como tripsina, plasmina, serina proteasas y similares; cadenas de azúcares (por ejemplo, cadenas de azúcares de α -fetoproteína, CA19-9, antígeno específico de la próstata, antígeno carcinoembrionario, sustancias que tienen cadenas de azúcares particulares producidas por células cancerígenas); lecitinas (por ejemplo, concaavalina A, lecitina *Lens culinaris*, lecitina *Phaseolus vulgaris*, lecitina *Datura stramonium*, lecitina de germen de trigo y similares) y similares. En la realización (2), los dos o más tipos de moléculas son lo que son

ES 2 269 054 T3

solubles en una solución, y en la realización (1) de la presente invención, los dos o más tipos de moléculas que son insolubles no provocan ningún problema.

5 Según la realización (2), entre las moléculas anteriormente mencionadas, si hay dos o más tipos de moléculas del mismo tipo y tienen un peso molecular diferente, o dos o más tipos de moléculas bastante diferentes, puede ser conseguida la separación. Las combinaciones de dos o más tipos de moléculas de la misma clase y que tienen un peso molecular diferente incluyen, por ejemplo, combinaciones de moléculas seleccionadas entre cadenas de nucleótidos (oligonucleótidos o polinucleótidos) y cromosomas y, por ejemplo, combinaciones de moléculas seleccionadas entre cadenas de péptidos, proteínas y similares. Las combinaciones de dos o más tipos de moléculas bastante diferentes
10 incluyen, por ejemplo, combinaciones de molécula(s) seleccionada(s) entre cadenas de nucleótidos (oligonucleótidos o polinucleótidos) y cromosomas con molécula(s) seleccionada(s) entre glúcidos, cadenas de péptidos y proteínas y combinaciones de azúcares con molécula(s) seleccionada(s) entre cadenas de péptidos, proteínas y lecitinas, y similares.

15 Las soluciones anteriormente descritas en las que los dos o más tipos de moléculas son disueltas incluyen muestras derivadas de un cuerpo vivo que incluyen fluidos corporales como suero, plasma, fluido cerebroespinal, fluido sinovial y linfático o excreciones como orina y heces, y sus materiales tratados. Los materiales tratados incluyen, por ejemplo, diluciones apropiadas de estas muestras derivadas de un cuerpo vivo con agua, tampones o similares, o las obtenidas a partir de una reconstitución con moléculas apropiadamente disolventes o suspensoras como se describió
20 anteriormente a partir de estas muestras derivadas de cuerpos en agua, tampones o similares. En la presente invención, las soluciones en las que son disueltos dos o más tipos de moléculas incluyen también las que contienen moléculas como las anteriormente descritas, que son químicamente sintetizadas.

Los tampones que pueden ser empleados incluyen tampones que son habitualmente empleados en la técnica, por ejemplo, tampones de tris(hidroximetilaminometano), tampones de Good, tampones de fosfato, tampones de borato y similares.

30 Cuando las soluciones anteriormente descritas tienen una conductividad elevada, se genera calor de Joule por la corriente que fluye en la solución a medida que es aplicado el voltaje, dando lugar a posibilidades de llevar a ebullición la solución. Por lo tanto, es preferible que las soluciones sean usadas con un ajuste apropiado de forma que la conductividad esté habitualmente en un intervalo de no más de 10 mS/dm, preferentemente no más de 200 μ S/cm.

En la presente invención, un electrodo que tiene una estructura capaz de formar un campo eléctrico horizontal y verticalmente no uniforme es uno elaborado de materiales conductores como, por ejemplo, aluminio, oro y similares.
35 Su estructura puede ser cualquier estructura capaz de provocar fuerzas dielectroforéticas, es decir, formar un campo eléctrico horizontal y verticalmente no uniforme, que incluye, por ejemplo, una forma interdigital [J. Phys. D: App. Phys. 258, 81-89 (1992); Biochim. Biophys. Acta., 964, 221-230 (1988) y similares]. Más específicamente, como se muestra en la Figura 2, las formas de triángulo, cuadrado, trapezoide, ola sinoidal o diente de sierra o similares son preferidas, y son posibles estructuras con disposiciones que se repiten de forma regular y continua de estas. Cuando el electrodo es usado con el fin de recoger una molécula específica, es preferible un electrodo que tenga una estructura
40 con esta disposición que se repite de forma regular y continua.

Este electrodo es elaborado habitualmente colocando un electrodo que tenga uno o más pares de las formas anteriormente mencionadas en una manera de dientes de peine sobre un sustrato hecho de materiales no conductores como, por ejemplo, vidrio, cuarzo, silicio y similares, empleando una tecnología de micromaquinarias conocida por sí misma [Biochem. Biophys. Acta., 964, 221-230 y similares]. La distancia entre electrodos adyacentes (enfrentados) no está especificada en particular, si se puede formar un campo eléctrico no uniforme que tenga una fuerte resistencia del campo eléctrico, y aunque no pueda ser mencionado en general, debe ser apropiadamente ajustado, dependiendo del tipo de moléculas que van a ser medidas. Por ejemplo, en el caso de cadenas de péptidos, proteínas y similares,
50 la distancia entre las partes más anchas en el electrodo (separación mínima) habitualmente es de no más de 10 μ , preferentemente 5 μ m, y en el caso de cadenas de nucleótidos (polinucleótidos, oligonucleótidos) y similares, es de no más de 100 μ m, preferentemente no más de 50 μ m. En el caso de los cromosomas, la separación mínima es habitualmente no más de 50 μ m, preferentemente no más de 10 μ m. Debe apreciarse que si la distancia entre los electrodos adyacentes (enfrentados) es demasiado grande en relación con la molécula de interés, es imposible formar un campo eléctrico no uniforme que tenga una suficiente resistencia eléctrica, y si la distancia es demasiado pequeña, puede ser
55 imposible capturar la molécula de interés.

El método de separación según la realización (2) se puede llevar a cabo, por ejemplo, de las siguientes formas.

60 Método A

Con el fin de separar una de otra dos o más tipos de moléculas disueltas en una solución colocando una solución en la que los dos o más tipos de moléculas están disueltas bajo un campo eléctrico no uniforme formado con el electrodo (sustrato de electrodo) anteriormente descrito, la separación se puede realizar según las diferencias en los modos
65 de movimiento de las moléculas existentes bajo un campo eléctrico no uniforme ajustando condiciones apropiadas en las que se forma el campo eléctrico no uniforme, con el fin de desplazar solamente la molécula que va a ser medida por fuerzas dielectroforéticas (por ejemplo, solamente la molécula que va a ser medida se desplaza hasta una posición particular por fuerzas dielectroforéticas y es capturada en la posición particular en el electrodo, y las

demás moléculas no reciben suficientes fuerzas de electroforesis y no son capturadas en una posición particular en el electrodo). Alternativamente, las moléculas pueden ser separadas en una posición débil y una posición fuerte en el campo eléctrico ajustando estas condiciones apropiadas a las que la molécula que va a ser medida recibe fuerzas dielectroforéticas positivas y las demás moléculas reciben la dielectroforesis negativa ajustando la permitividad y la conductividad del medio y la frecuencia del campo eléctrico aplicado.

Método B

La separación se puede realizar permitiendo que la molécula que va a ser medida se desplace en el campo eléctrico no uniforme mediante el uso del electrodo (sustrato del electrodo) anteriormente descrito y utilizando seguidamente la interacción provocada en el mismo entre las fuerzas de dielectroforesis causadas a las moléculas por el campo eléctrico y el movimiento de las moléculas. En este caso, las moléculas que reciben fuerzas dielectroforéticas más fuertes se desplazan más lentamente que las que reciben fuerzas dielectroforéticas débiles, por lo que es posible hacer la separación de las moléculas más fácilmente.

Más específicamente, es empleado un sustrato de electrodo que, como se muestra en la Figura 3, tiene el electrodo anteriormente mencionado y una trayectoria de flujo tal que una solución en la que estén disueltos los dos o más tipos de moléculas se pueda desplazar en el electrodo, a con la aplicación de un voltaje al electrodo, una solución en la que están disueltos dos o más tipos de moléculas se puede permitir que se desplace en un campo eléctrico no uniforme que tenga una resistencia del campo eléctrico de 500 kV/m o mayor, formado por el voltaje aplicado. En la Figura 3, la flecha indica la dirección del flujo de una solución en la que están disueltos dos o más tipos de moléculas.

Por lo tanto, las moléculas en una solución son atraídas hacia las proximidades de un electrodo que tiene un campo eléctrico más fuerte por fuerzas electroforéticas en el electrodo. El movimiento de las moléculas está controlado por tres factores: la fuerza dielectroforética F_d , la resistencia debida al flujo en la trayectoria del flujo F_v y la fuerza debida al movimiento térmico F_t . (1) En el caso de $F_d \gg F_v + F_t$, las moléculas son capturadas (atrapadas) en el electrodo, (2) en el caso de $F_d \ll F_v + F_t$, las moléculas son separadas por el flujo en la trayectoria de flujo, independientemente del campo eléctrico. (3) En el caso de $F_d \approx F_v + F_t$, las moléculas son portadas en dirección descendente con adsorción y desorción repetidas en el electrodo, de forma que las moléculas llegan a la salida con retraso, con relación a flujo ajustado en la trayectoria de flujo. Por lo tanto, si la separación se realiza bajo condiciones como en el caso (1) anteriormente mencionado, es posible separar dos o más tipos de moléculas unas de otras, ya que las moléculas que reciben fuerzas dielectroforéticas grandes son capturadas en una posición particular en el electrodo, y las demás moléculas no son capturadas en una posición particular en el electrodo y se separan del flujo. Si la separación se realiza bajo condiciones como las del caso (3) anteriormente mencionado, es posible separar dos o más tipos de moléculas unas de otras, ya que las moléculas que reciben fuerzas dielectroforéticas mayores se desplazan a una velocidad inferior en la trayectoria de flujo que las moléculas que reciben fuerzas dielectroforéticas más pequeñas.

En el Método B anteriormente descrito, una solución en la que están disueltas dos o más tipos de moléculas puede ser desplazada, por ejemplo, usando un medio físico que fluye con una bomba o similar, o por flujo electroosmótico.

Según el método de separación de la realización 2, es posible recoger la molécula específica que va a ser medida en una solución en la que estén disueltos dos o más tipos de moléculas.

Por lo tanto, en el método de separación, Método A anteriormente descrito, la molécula específica o las demás moléculas pueden ser recogidas respectivamente, por ejemplo, separando los dos o más tipos de moléculas unas de otras de forma tal que la molécula específica sea capturada en una posición particular en el electrodo y las demás moléculas no sean capturadas en una posición particular en el electrodo, y seguidamente se lava el electrodo con un tampón apropiado habitualmente empleado en la técnica, agua, o similar mientras se aplica un campo eléctrico, y seguidamente se deja de aplicar el campo eléctrico y seguidamente se lava el electrodo con un tampón apropiado habitualmente empleado en la técnica, agua o similar.

En el método de separación, Método B anteriormente descrito, por ejemplo, cuando la separación se lleva a cabo bajo la condición (1) anteriormente descrita, las moléculas específicas o las demás moléculas pueden ser recogidas respectivamente recogiendo una primera fase móvil que contenga moléculas, reciben fuerzas dielectroforéticas pequeñas y se desplazan sin ser capturadas en una posición particular en el electrodo y, después de eso, se recoge una solución lavada que contiene moléculas que reciben fuerzas dielectroforéticas grandes y que han sido capturadas en una posición particular en el electrodo durante la aplicación del campo eléctrico permitiendo que estas moléculas se desplacen hacia la salida de la trayectoria de flujo dejando de aplicar el campo eléctrico y se lava el electrodo con un tampón apropiado habitualmente empleado en la técnica, agua o similar.

En el método de separación, Método B anteriormente descrito, por ejemplo, cuando la separación se lleva a cabo bajo la condición (1) anteriormente descrita, las moléculas específicas o las demás moléculas pueden ser recogidas, respectivamente, recogiendo una primera fase móvil que contenga moléculas que reciben fuerzas dielectroforéticas pequeñas y desplazándolas sin ser capturadas en una posición particular en el electrodo y, después de eso, recogiendo una solución lavada que contenga moléculas que reciben fuerzas dielectroforéticas pequeñas y desplazándolas sin ser capturadas en una posición particular en el electrodo y, después de eso, recoger una solución lavada que contenga moléculas que reciben fuerzas dielectroforéticas grandes y que han sido capturadas en una posición particular en el electrodo durante la aplicación del campo eléctrico, permitiendo que estas moléculas se desplacen hacia la salida de

la trayectoria de flujo dejando de aplicar el campo eléctrico y lavando el electrodo con un tampón apropiado habitualmente empleado en la técnica, agua o similar. Cuando la separación se lleva a cabo bajo la condición (3) anteriormente descrita, las moléculas específicas o las demás moléculas pueden ser recogidas respectivamente recogiendo, a la salida de la trayectoria del flujo, una fase móvil que contenga moléculas que reciben fuerzas dielectroforéticas pequeñas en primer lugar, y seguidamente una fase móvil que contiene moléculas que se desplazan a una velocidad inferior y que reciben fuerzas dielectroforéticas mayores.

La molécula específica que va a ser medida en una solución puede ser medida midiendo uno cualquiera de los dos o más tipos de moléculas separadas mediante el método de separación de las realizaciones (1) y (2) de la presente invención mediante métodos de acuerdo con las propiedades de la molécula.

En primer lugar, se proporciona la siguiente descripción considerando los casos en que se emplea el método de separación de la realización (1) de la presente invención.

Un componente (una molécula específica [una molécula que va a ser medida] y/o la molécula distinta de la molécula específica) puede ser medido separando una sustancia compleja que resulta de la interacción entre la “molécula específica” (una molécula que va a ser medida) y la “sustancia capaz de cambiar propiedades dielectroforéticas de la molécula específica” que se une a la molécula específica de las moléculas distintas de la molécula específica contenidas en la muestra mediante el método de separación de la realización (1) de la presente invención, seguido de la medición de la molécula específica (la molécula que va a ser medida) en la sustancia compleja o la molécula distinta de la “molécula específica”.

En el método anteriormente mencionado, la “molécula específica” es una que puede ser medida (detectada) en sí misma o marcada con una sustancia marcadora mediante algún método, o alternativamente una unida a una “sustancia que se une a la molécula específica” que puede ser medida (detectada) en sí misma o marcada con una sustancia marcadora. La sustancia marcadora, la “sustancia que se une a la molécula específica” y el método de marcado son como se describieron anteriormente.

Además, una molécula específica (una molécula que va a ser medida) en una muestra puede ser medida rápida y fácilmente llevando a cabo la separación de una sustancia compleja (sustancia compleja 1) que se forma a partir de la “molécula específica” (la molécula que va a ser medida), la sustancia que se une a la molécula específica y una “sustancia capaz de cambiar propiedades dielectroforéticas de la molécula específica” que se une a la molécula específica de la sustancia (libre) que se une a la molécula específica que no está involucrada en la formación de la sustancia compleja, denominada separación B/F, mediante el método de separación de la realización (1) de la presente invención, seguido de la medición de la sustancia compleja 1, la molécula específica (la molécula que va a ser medida) o la sustancia que se une a la molécula específica en la sustancia compleja 1, o la sustancia libre que se une a la molécula específica que no está involucrada en la formación de la sustancia compleja.

En los métodos anteriormente mencionados, generalmente, como la sustancia que se une a la molécula específica se usa una “sustancia que se une a la molécula específica” que puede ser medida (detectada) en sí misma o marcada con una sustancia marcadora mediante algún método.

Además de ello, mediante el método de separación de la realización (1) de la presente invención, como se describió anteriormente, se realiza la separación de un complejo de la molécula específica (la molécula que va a ser medida), una sustancia que se une a la molécula específica (o molécula que se une a la molécula específica marcada con una sustancia marcadora) y una “sustancia capaz de cambiar propiedades dielectroforéticas de la molécula específica” (una sustancia compleja 1) formada mediante la reacción de la molécula específica (la molécula que va a ser medida), una sustancia que se une a la molécula específica (o molécula que se une a la molécula específica marcada con una sustancia marcadora) y una “sustancia capaz de cambiar propiedades dielectroforéticas de la molécula específica” de la sustancia libre que se une a la molécula específica (o la sustancia marcada libre que se une a la molécula específica). Después de eso, es posible medir la presencia o ausencia de la molécula específica (la molécula que va a ser medida) en una muestra detectando la sustancia compleja 1 separada, basándose en las propiedades de la sustancia que se une a la molécula específica en la sustancia compleja 1 (o la sustancia marcadora unida a la sustancia de unión a la molécula específica en la sustancia compleja 1).

Además de ello, es posible medir no solamente la presencia de la molécula específica (la molécula que va a ser medida) en una muestra, sino también determinar la cantidad de la molécula específica (molécula que va a ser medida) en una muestra cuantitativamente, por ejemplo, según métodos descritos con posterioridad.

Mediante el método de separación de la realización (1) de la presente invención, como se describió anteriormente, se realiza la separación de una sustancia compleja de la molécula específica (la molécula que va a ser medida), una sustancia que se une a la molécula específica (o una sustancia marcada que se une a la molécula específica marcada con una sustancia marcadora) y una “sustancia capaz de cambiar las propiedades dielectroforéticas de la molécula específica (una sustancia compleja 1) de la sustancia libre que se une a la molécula específica (o la sustancia marcada libre que se une a la molécula específica marcada con una sustancia marcadora). Después de eso, es posible medir la cantidad de la sustancia que se une a la molécula específica en la sustancia compleja 1 (o la cantidad de la sustancia marcadora que se une a la sustancia que se une a la molécula específica en la sustancia compleja 1) o la cantidad de la sustancia libre que se une a la molécula específica (o la cantidad de la sustancia marcadora que está unida a la

sustancia libre que se une a la molécula específica) mediante métodos de medición de acuerdo con las propiedades de la sustancia que se une a la molécula específica o la sustancia marcadora y, por tanto, la cantidad de molécula específica (molécula que va a ser medida) en una muestra, puede ser medida basándose en la cantidad.

5 Alternativamente, la molécula específica en una muestra puede ser medida mediante métodos denominados competitivos en los que se emplea una molécula específica marcada para reacciones competitivas entre la molécula específica marcada y la molécula específica en la muestra.

10 Por lo tanto, es posible que poniendo en contacto una muestra que contiene la molécula específica, la molécula específica marcada con una sustancia marcadora (la molécula específica marcada) y una “sustancia capaz de cambiar propiedades dielectroforéticas de la molécula específica” con otra, se forme una mezcla de una sustancia compleja marcada de la molécula específica marcada y la “sustancia capaz de cambiar propiedades dielectroforéticas de la molécula específica” y una sustancia compleja de la molécula específica y la “sustancia capaz de cambiar propiedades dielectroforéticas de la molécula específica” y la mezcla se somete a dielectroforesis para separar la sustancia compleja
15 que contiene la molécula específica marcada de la molécula específica marcada, y la cantidad de la sustancia marcadora unida a la sustancia específica marcada en la sustancia compleja marcada separada o la cantidad de la sustancia marcadora unida a la molécula específica marcada libre se determina mediante métodos de medición de acuerdo con las propiedades de la sustancia marcadora, y la cantidad de una molécula específica en una muestra se determina sobre la base de la cantidad obtenida.

20 En estos métodos anteriormente mencionados, con el fin de determinar la cantidad de la molécula específica en una muestra sobre la base de la cantidad resultante de la molécula específica, la sustancia que se une a la molécula específica o la sustancia marcadora, la cantidad de la molécula específica en una muestra puede ser calculada, por ejemplo, usando curvas de calibración respectivas que muestran la relación entre las cantidades de la molécula específica y las cantidades de la sustancia marcadora en la sustancia compleja, la cantidad de la sustancia que se une a la molécula específica en la sustancia compleja (o la sustancia que se une a la molécula específica marcada por una sustancia marcadora), las cantidades de la sustancia marcadora de la molécula específica marcada libre o la cantidad de la sustancia libre que se une a la molécula específica (o la sustancia marcadora en la sustancia marcada que se une a la molécula específica marcada por una sustancia marcadora), las curvas de calibración que están siendo obtenidas
25 llevando a cabo mediciones de una manera similar con muestras que tienen concentraciones conocidas de la molécula específica.

30 Además, una cantidad relativa de la molécula específica en una muestra puede ser calculada y puede ser conectado también un error encontrado entre los dispositivos de separación dielectroforética, por ejemplo, añadiendo a una muestra una concentración conocida de una sustancia detectable como un patrón interno, y comparando una cantidad del patrón interno con una cantidad de la sustancia marcadora o sustancia que se une a la molécula específica (o la sustancia marcada que se une a la molécula específica) en una sustancia compleja resultante, o una cantidad de la sustancia marcadora en la molécula específica marcada libre o la sustancia libre que se une a la molécula específica (o la sustancia marcadora en la sustancia marcada libre que se une a la molécula específica).
35

40 En el método anteriormente mencionado, la sustancia detectable es una que puede ser medida (detectada) por sí misma o marcada con una sustancia marcadora mediante algún método. Por ejemplo, la sustancia detectable incluye el ejemplo concreto como la molécula específica anteriormente mencionada y la sustancia mejoradora de la separación, con la condición de que sea distinta del componente contenido en la muestra y no se pueda unir a la molécula que va a ser medida. La sustancia marcadora y el método de marcado son los mismos que se describieron anteriormente.
45

La siguiente descripción se proporciona con respecto a los casos en que se emplea el método de separación de la realización (2) de la presente invención.

50 La molécula que va a ser medida (molécula A) en los métodos de medición que emplean el método de separación de la realización (2) de la presente invención puede ser una cualquiera que sea el objeto de la separación como se describió anteriormente y sea soluble en una solución como la anteriormente descrita, en que (1) una molécula capaz de interactuar mutuamente con la molécula A para formar una sustancia compleja (una molécula B) existe, la molécula B que posee propiedades capaces de ser medidas (detectadas) por sí misma mediante algún método o
55 que es capaz de ser marcada con una sustancia marcadora; o (2) la molécula A puede ser marcada con una sustancia marcadora y una molécula capaz de interactuar mutuamente con la molécula A para formar una sustancia compleja marcada (una molécula B) existe.

60 Por lo tanto, la molécula A en una muestra puede ser medida rápida y fácilmente llevando a cabo la separación de una sustancia compleja que resulta de la interacción entre la molécula que va a ser medida (la molécula A) y una sustancia que se une específicamente a la molécula que va a ser medida (una molécula B) (sustancia compleja 2), denominada separación B/F, mediante el método de separación de la realización (2) de la presente invención y midiendo seguidamente la sustancia compleja 2, la molécula A o la molécula B en la sustancia compleja 2 (o la sustancia marcadora unida a la molécula B en la sustancia compleja 2) o la molécula libre B (o la sustancia marcadora unida a la molécula B libre).
65

A saber, una muestra que contiene la molécula A se hace reaccionar con la molécula B (o la molécula B marcada con una sustancia marcadora [una molécula marcada B]), y la sustancia compleja 2 resultante de la molécula A y la

ES 2 269 054 T3

molécula B (o la molécula B marcada) se separa de la molécula B libre (o la molécula B marcada) mediante el método de separación de la realización (2) de la presente invención. Después de eso, la presencia o ausencia de la molécula A en la muestra puede ser medida detectando la sustancia compleja 2 separada, basándose en las propiedades de la molécula B en la sustancia compleja 2 (o la sustancia marcadora unida a la molécula B en la sustancia compleja).

5

Además, es posible medir no solamente la presencia de la molécula A en una muestra, sino también determinar la cantidad de la molécula A en una muestra cuantitativamente, por ejemplo, según el siguiente método.

Es decir, una muestra que contiene la molécula A se hace reaccionar con la molécula B (o la molécula B marcada con una sustancia marcadora [una molécula B marcada]), y la sustancia compleja 2 resultante de la molécula A y la molécula B (o molécula B marcada) se separa de la molécula B libre (o la molécula B marcada libre) mediante el método de separación de la realización (2) de la presente invención. Después de eso, es posible medir la cantidad de la molécula B en la sustancia compleja 2 separada (la sustancia marcadora unida a la molécula B en la sustancia compleja 2 separada) o la cantidad de la molécula B libre (o la sustancia marcadora unida a la molécula B marcada libre) mediante métodos de medición de acuerdo con las propiedades de la molécula B o la sustancia marcadora y, por tanto, la cantidad de la molécula A en la muestra es medida sobre la base de la cantidad obtenida.

15

Alternativamente, la molécula A en una muestra puede ser medida mediante métodos denominados competitivos en los que una molécula A marcada es empleada para reacciones competitivas entre la molécula A marcada y la molécula A en la muestra.

20

Por lo tanto, una muestra que contiene una molécula A, la molécula A marcada con una sustancia marcadora (la molécula A marcada) y una molécula B se hacen reaccionar para formar una sustancia compleja marcada de la molécula A marcada y la molécula B y una sustancia compleja de la molécula A y la molécula B, y seguidamente la sustancia compleja marcada se separa de la molécula específica marcada libre que va a ser medida A mediante el método de separación según la presente invención, como se describió anteriormente. Después de eso, es posible medir la cantidad de la sustancia marcadora unida a la molécula marcada A en la sustancia compleja marcada separada, o la cantidad de la sustancia marcadora unida a la molécula A marcada libre mediante métodos de medición de acuerdo con las propiedades de la sustancia marcadora y, por tanto, se mide la cantidad de la molécula A en la muestra sobre la base de la cantidad obtenida.

25

30

En los métodos anteriormente mencionados, con el fin de determinar la cantidad de la molécula A en una muestra sobre la base de las cantidades resultantes de la molécula B o la sustancia marcadora, la cantidad de la molécula A en una muestra puede ser calculada, por ejemplo, usando curvas de calibración respectivas que muestran la relación entre las cantidades de la molécula A y las cantidades de la sustancia marcadora en la sustancia compleja marcada, las cantidades de la molécula B (o la sustancia marcadora) en la sustancia compleja, las cantidades de la sustancia marcadora en la molécula A marcada libre, o las cantidades de la molécula B libre (o la sustancia marcadora en la molécula B marcada), siendo obtenida la curva de calibración llevando a cabo mediciones de una manera similar con muestras que tienen concentraciones conocidas de la molécula A.

40

Además, puede ser calculada una cantidad relativa de la molécula específica en una muestra y puede ser conectado también un error encontrado entre los dispositivos de separación dielectroforética, por ejemplo, añadiendo a una muestra una concentración conocida de una sustancia detectable como un patrón interno, y comparando una cantidad del patrón interno con una cantidad de la sustancia marcadora o la molécula B (o la sustancia marcada que se une a la molécula específica) en una sustancia compleja resultante, o una cantidad de la sustancia marcadora en la molécula A marcada libre o la molécula B libre (o la sustancia marcadora en la molécula B marcada libre).

45

En el método anteriormente mencionado, la sustancia detectable es una que puede ser medida (detectada) por sí misma o marcada con una sustancia marcadora mediante algún método. Por ejemplo, la sustancia detectable incluye el ejemplo concreto como la molécula específica anteriormente mencionada y la sustancia mejoradora de la separación, con la condición de que sea una distinta del componente contenido en la muestra y no pueda unirse a la molécula que va a ser medida. La sustancia marcadora y el método de marcado son los mismos que los anteriormente descritos.

50

En los métodos anteriormente mencionados, la molécula que se une específicamente a la molécula A (una molécula B) es el mismo que la "sustancia que se une específicamente a la molécula específica" como se describió previamente.

55

Las sustancias marcadoras que pueden ser usadas en la presente invención son cualesquiera sustancias habitualmente usadas en técnicas como inmunoensayo enzimático (EIA), radioinmunoensayo (RIA), fluoroinmunoensayo (FIA), métodos de hibridación y similares, y están ilustrados por enzimas como fosfatasa alcalina (ALP), β -galactosidasa (β -Gal), peroxidasa (POD), micropoxidasa, glucosa oxidasa (GOD), glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), malato deshidrogenasa y luciferasa; colorantes como Coomassie Brilliant Blue R250 y metil orange; radioisótopos como Tc^{99m}, I¹³¹, I¹²⁵, C¹⁴, H³, P³² y S³⁵; sustancias fluorescentes como, por ejemplo fluoresceína, rodamina, dansilo, fluorescamina, cumarina, naftilamina o sus derivados y europio (Eu); sustancias luminiscentes como luciferina, isoluminol, luminol y bis(2,4,6-trifluorofenil)oxalato; sustancias que tienen absorción en el campo ultravioleta como fenol, naftol, antraceno y sus derivados; sustancias que tienen propiedades como agentes marcadores del espín ilustrados por compuestos con grupos oxilo como 4-amino-2,2,6,6-tetrametilpiperidino-1-oxilo, 3-amino-2,2,5,5-tetrametilpiperidino-1-oxilo y 2,6-di-t-butil- α -(3,5-di-t-butil-4-oxo-2,5-ciclohexadien-1-ilideno)-p-toliloxilo y similares.

65

El marcado de una molécula A o una molécula B con una sustancia marcadora se puede realizar mediante uno cualquiera de los métodos habituales comúnmente usados en la técnica, como los métodos de marcado que se emplean en EIA, RIA, FIA, métodos de hibridación o similares, que son conocidos por sí mismos [por ejemplo, Ikagaku Zikken Koza (Methods in Medical and Chemical Experiments) vol. 8, editado por Y. Yamamura, 1ª ed., Nakayama-Shoten, 1971; A. Kuwano, Illustrative Fluorescent Antibodies, 1ª ed., Softscience Inc., 1983; Enzyme Immunoassays, editado por E. Ishikawa, T. Kawai y K. Miyai, 3ª ed., Igaku-Shoin, 1987; Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed., J. Sambrook, E.F. Fritsch y T. Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, y similares], y métodos habituales que emplean reacciones de avidina (o estreptavidina) y biotina.

En el método de medición de la presente invención (el segundo método, realización (2)), las condiciones en la reacción de una molécula A y una molécula B (o una molécula marcadora B) para formar una sustancia compleja 2, o la reacción de una molécula A (o la molécula A marcada) y una molécula B para formar una sustancia compleja marcada puede ser en condiciones tales que no se inhiba la formación de la sustancia compleja 2 (o la sustancia compleja marcada). Por lo tanto, estas reacciones se pueden llevar a cabo, por ejemplo, según métodos habituales como las condiciones de reacción en la formación de la sustancia compleja 2 (o la sustancia compleja marcada) en EIA, RIA, FIA, métodos de hibridación o similares, que son conocidos por sí mismos. También, en el primer método de la presente invención, las condiciones de la reacción en la formación de una sustancia compleja 1 de una molécula específica (la molécula específica marcada), una sustancia que se une a la molécula específica y una “sustancia capaz de cambiar propiedades dielectroforéticas” [o de un material específico (la molécula específica marcada) y la “sustancia capaz de cambiar propiedades dielectroforéticas”] o una sustancia compleja marcada de la molécula específica marcada, una sustancia que se une a la molécula específica y una “sustancia capaz de cambiar propiedades dielectroforéticas” pueden ser aquellas según las condiciones de reacción anteriormente mencionadas.

En el método de la realización (2) de la presente invención (el segundo método), la concentración de la molécula B (o la molécula B marcada) usado en la reacción de la molécula A y la molécula B (o la molécula B marcada) para formar una sustancia compleja 2 no puede ser mencionado en general debido a la variación según el límite de detección de la molécula A y similar, y es preferible que la molécula B (o molécula B marcada) esté presente habitualmente en las soluciones de la reacción sobre una concentración que permita unirse a todas las moléculas A correspondientes a la concentración del límite de detección, preferentemente el doble de tal concentración, más preferentemente cinco veces mayor que tal concentración. También, según estas condiciones, pueden ser ajustadas la concentración de la “molécula específica” y la “sustancia que se une a la molécula específica” (o la “sustancia que se une a la molécula específica” marcada), o la “sustancia capaz de cambiar propiedades dielectroforéticas de la molécula específica” que van a ser usadas en el método de la realización (1) de la presente invención (el primero método).

En el método de la realización (2) (el segundo método), la concentración de la molécula A marcada y la molécula B usadas en la reacción de la molécula A, la molécula A marcada y la molécula B para formar una sustancia compleja marcada puede ser ajustada en la medida apropiada, dependiendo del ajuste del nivel del límite de detección de la molécula A y la sensibilidad de medición y similares. La concentración de la molécula A marcada que va a ser usada es al menos más que una concentración que permita unir todas las moléculas B presentes en la solución de la reacción. También, según estas condiciones puedan ser ajustadas, la concentración de las “moléculas específicas marcadas” y la “sustancia que se une a la molécula específica” (o la “sustancia que se une a la molécula específica” marcada) usadas en el método de la realización (1) de la presente invención (el primer método).

En el método de la realización (2) (el segundo método), el pH y la temperatura de la reacción, que no pueden ser mencionados en general debido a variaciones dependientes de las propiedades de la molécula A y la molécula B, pueden estar en el intervalo en que no es inhibida la formación de la sustancia 2 compleja (o la sustancia compleja marcada). El pH está habitualmente en el intervalo de 2 a 10, preferentemente 5 a 9, y la temperatura está habitualmente en el intervalo de 0 a 90°C, preferentemente 20 a 80°C. Para el tiempo de reacción, el tiempo requerido para formar una sustancia compleja 2 (o la sustancia compleja marcada) es diferente dependiendo de las propiedades de la molécula A y la molécula B, y la reacción se puede realizar habitualmente en la medida apropiada durante un período de unos pocos segundos a una pocas horas. También, el pH de la reacción, la temperatura y el tiempo de reacción en el método de la realización (1) de la presente invención (el primer método) pueden ser ajustados según estas condiciones.

En los métodos de medición de la presente invención, se pueden llevar a cabo mediciones mediante métodos predeterminados respectivos según el tipo de analitos, con el fin de medir la molécula B en la sustancia compleja 2 separada (o la sustancia marcadora unida a la molécula B en la sustancia compleja 2), la molécula B libre (o la sustancia marcadora unida a la molécula B marcada libre), la sustancia que se une a la molécula específica en la sustancia compleja 1 (o la sustancia marcadora unida a una sustancia que se une a la molécula específica en la sustancia compleja 1), la sustancia libre que se une a la molécula específica (o la sustancia libre que se une a la molécula específica marcada por una sustancia marcadora), la sustancia marcadora unida a la molécula A marcada en la sustancia compleja marcada, la sustancia marcadora unida a la molécula A marcada, la sustancia marcadora unida a la molécula específica marcada en la sustancia compleja marcada o la sustancia marcadora unida a la molécula específica, marcada libre. Por ejemplo, si tienen actividades enzimáticas, las mediciones se pueden llevar a cabo según métodos habituales como métodos EIA y de hibridación, por ejemplo, métodos descritos en “Enzyme Immunoassays” (Proteins, Nucleic Acids and Enzymes, Extra issue n° 31), editado por T. Kitagawa, T. Nambara, A. Tsuzi y E. Eshikawa, pag. 51-63, Kyoritsu Publishing Inc., publicado el 10 de Septiembre de 1987) y similares. Si las sustancias que van a ser medidas son radioactivas, las mediciones se pueden llevar a cabo seleccionando un instrumento de medición apropiado como un contador GM de inmersión, un contador de centelleo líquido, un contador de centelleo de tipo pocillos y similar, dependiendo del tipo

y la resistencia de la radiación emitida a partir de las sustancias radioactivas, según métodos habituales como RIA y métodos de hibridación (véase, por ejemplo, "Methods in Medical and Chemical Experiments", vol. 8, editado por Y. Yamamura, 1ª ed. Kakayama-Shoten, 1971; "Methods in Biochemical Experiments 2: Tracer Experiments" Parte II. S. Takemura y T. Honzyo, pag. 501-525, Tokyo Kagaku Dozin, Inc., publicado el 25 de Febrero de 1977). Si sus propiedades son fluorescentes, la medición se puede llevar a cabo según métodos habituales como FIA y métodos de hibridación que emplean instrumentos de medición como fluorofotómetros, microscopios láser confocales o similares, por ejemplo, métodos descritos en "Illustrative Fluorescent Antibodies" (A. Kuwao, 1ª ed., Softscience Inc., 1983), "Methods in Biochemical Experiments 2: Chemistry of Nucleic Acids III", M. Miyoshi, pag. 299-318, Tokyo Kagaku Dozin, Inc., publicado el 15 de Diciembre de 1977) y similares. Si sus propiedades son luminiscentes, la medición se puede llevar a cabo según métodos habituales que emplean instrumentos de medición como contadores de fotones, por ejemplo, métodos descritos en "Enzyme Immunoassays" (Proteins, Nucleic Acids and Enzymes", Extra issue nº 31), editado por T. Kitagawa, T. Nambra, A. Tsuzi y E. Ishikawa, pag. 252-263, Kyoritsu Publishing Inc., publicado el 10 de Septiembre de 1987) y similares. Si sus propiedades son las que poseen absorción en el campo ultravioleta, la medición se puede llevar a cabo mediante métodos habituales empleando instrumentos de medición como espectrofotómetros, y si sus propiedades son cromógenas, la medición se puede llevar a cabo mediante métodos habituales empleando instrumentos como espectrofotómetros y microscopios. Si sus propiedades son propiedades de espín, la medición se puede llevar a cabo según métodos que emplean instrumentos de resonancia de espín electrónico, por ejemplo, métodos descritos en "Enzyme Immunoassays" ((Proteins, Nucleic Acids and Enzymes", Extra issue nº 31), editado por T. Kitagawa, T. Nambra, A. Tsuzi y E. Ishikawa, pag. 264-271, Kyoritsu Publishing Inc., publicado el 10 de Septiembre de 1987) y similares.

En los métodos de medición de la presente invención, para medir moléculas respectivas separadas mediante los métodos de separación según la presente invención como se describieron anteriormente, las mediciones se pueden llevar a cabo, por ejemplo, midiendo si la molécula compleja o la sustancia compleja y/o la molécula B libre o la "sustancia que se une a la molécula específica" libre son separadas o capturadas en una posición particular en el electrodo (una zona del campo eléctrico fuerte y/o débil), mediante la observación directa de la molécula B en la sustancia compleja 2 (o la sustancia marcadora unida a la molécula B en la sustancia 2 compleja), la molécula B libre (o la sustancia marcadora unida a la molécula B marcada libre), la sustancia que se une a la molécula específica en la sustancia compleja 1 (o la sustancia marcadora unida a la sustancia que se une a la molécula específica en la sustancia compleja 1) o la sustancia libre que se une a la molécula específica (o la sustancia marcada libre que se une a la molécula específica). En este caso, es preferible que la molécula B, la molécula específica o la sustancia marcadora tenga propiedades de radiactividad, fluorescencia, luminiscencia, cromógenas, de espín o similares.

Una solución eluyente del sustrato de electrodo anteriormente descrito puede ser guiada directamente a una unidad de detección, en la que la molécula B en la sustancia compleja 2 (o la sustancia marcadora unida a la molécula B en la sustancia compleja 2) en la solución eluyente, la molécula B libre (o la sustancia marcadora unida a la molécula B marcada, libre) en la solución eluyente, la sustancia que se une a la molécula específica en la sustancia compleja 1 (o la sustancia marcadora unida a la sustancia que se une a la molécula específica en la sustancia compleja 1) en la solución eluyente, la sustancia libre que se une a la molécula específica (o la sustancia marcada libre que se une a la molécula específica) en la solución eluyente, la sustancia marcadora unida a la molécula A marcada en la sustancia compleja marcada en la solución eluyente, la sustancia marcadora unida a la molécula específica marcada en la sustancia compleja marcada en la solución eluyente, o la sustancia marcadora unida a la molécula específica marcada, libre en la solución eluyente pueden ser medidas directamente. Alternativamente, se puede realizar una medición similar a la anterior mediante el uso del electrodo equipado con la unidad de detección. Usando estos métodos como anteriormente, se pueden realizar mediciones más rápidamente.

En este caso, si las actividades enzimáticas son las propiedades que son detectables mediante algún método y poseídas por la molécula B, la sustancia que se une a la molécula específica, la molécula específica o la sustancia marcadora, es necesario proporcionar una unidad de reacción entre la terminal en sentido descendente del electrodo en el sustrato y la unidad de detección, a la que se suministran reactivos para medir las actividades enzimáticas para llevar a cabo la reacción con la solución eluyente. Los reactivos para medir las actividades enzimáticas usados en la unidad de reacción pueden ser los preparados según los métodos descritos en "Enzyme Immunoassays" (Proteins, Nucleic Acids and Enzymes, Extra issue nº 31), editado por T. Kitagawa, T. Nambara, A. Tsuzi y E. Eshikawa, pag. 51-63, Kyoritsu Publishing Inc., publicado el 10 de Septiembre de 1987) y similares, o pueden ser apropiadamente seleccionados para este uso reactivos empleados de estuches de ensayo disponibles en el comercio para ensayos clínicos. También, en el caso de que las propiedades de la molécula B o la sustancia marcadora no tengan actividades enzimáticas, es opcional proporcionar una unidad de reacción adecuada entre la terminal en sentido descendente del electrodo en el sustrato y la unidad de detección, a la que se suministrar reactivos predeterminados para reaccionar para los fines de aumentar la sensibilidad de la detección y similares.

Entre los dos métodos de medición, en este último método, es decir, el método en el que las moléculas respectivas son guiadas a la unidad de detección después de la separación en el electrodo, es probable que la eficacia de la separación se reduzca, o la sensibilidad de detección de las moléculas que han sido separadas se reduzca, debido a influencias, por ejemplo, del caudal de la solución de elución, la forma de la trayectoria del flujo de elución, la difusión en la solución eluyente de cada molécula durante el movimiento a la unidad de detección y similares. Por lo tanto, si solamente una molécula específica está previsto que sea detectada, es decir, el método en el que las moléculas respectivas separadas son detectadas observando directamente la superficie del electrodo después de la separación en el electrodo es ventajoso, por ejemplo, porque este método puede superar diversos problemas que resul-

tan de influencias de la difusión, por ejemplo, como se describió anteriormente, y adicionalmente el tiempo necesario desde la separación hasta la detección puede ser reducido mediante este método, ya que no hay necesidad de guiar las respectivas moléculas separadas hasta la unidad de detección. También, este método es ventajoso, por ejemplo, por cuanto el método conduce a una reducción del espacio de la sustancia ya que la reacción, separación y detección se llevan a cabo en el sustrato del electrodo y, por tanto, las unidades de reacción, separación y detección pueden estar integradas, y además de ello se puede esperar que un dispositivo detector en sí mismo pueda ser miniaturizado, ya que no es necesaria la alimentación de una solución eluyente.

Los métodos de medición de la presente invención se pueden llevar a cabo según métodos conocidos por sí mismos como se describió anteriormente, excepto en cuanto al empleo de los métodos de separación de la presente invención, y los reactivos usados se seleccionan también en la medida apropiada según métodos conocidos por sí mismos.

Es ventajoso llevar a cabo los métodos anteriormente mencionados de la presente invención para preparar, por adelantado, un estuche de ensayo de medición dielectroforética que comprenda reactivos y otros para ser usados para llevar a cabo la presente invención.

Específicamente, el estuche de ensayo dielectroforético de la presente invención comprende una “sustancia que se une a la molécula específica” y una “sustancia capaz de cambiar propiedades dielectroforéticas de la molécula específica” en el que estas sustancias pueden formar una sustancia compleja con la “molécula específica” en una muestra.

Alternativamente, el estuche de ensayo dielectroforético de la presente invención comprende la “molécula específica marcada con una sustancia marcadora”, una “sustancia que se une a la molécula específica” y una “sustancia capaz de cambiar propiedades dielectroforéticas de la molécula específica”, en que estas sustancias pueden formar una sustancia compleja con la “molécula específica” en una muestra o la “molécula específica marcada con una sustancia marcadora”.

En los estuches de ensayo anteriormente mencionados, las realizaciones preferidas y los ejemplos específicos de la “sustancia que se une a la molécula específica”, la “sustancia capaz de cambiar propiedades dielectroforéticas de la molécula específica” y la “molécula específica marcada con una sustancia marcadora”, como se describieron anteriormente, y la “sustancia capaz de cambiar propiedades dielectroforéticas de la molécula específica” es preferentemente una sustancia que se une a cualquiera o a ambas de la “molécula específica” y la “sustancia que se une a la molécula específica”. Los estuches de ensayo anteriormente mencionados pueden además ser combinados con aparatos dielectroforéticos.

Además, los estuches de ensayo pueden contener también reactivos habitualmente usados en la técnica como se describió anteriormente, patrones de la molécula específica o la molécula A, y similares.

Lo que sigue describirá los métodos de medición de la presente invención más en detalle, proporcionando un ejemplo en el caso de emplear un método de hibridación para detectar una secuencia génica específica.

En primer lugar, una sonda de nucleótidos que tiene una longitud apropiada que tiene una secuencia complementaria para la secuencia génica que va a ser detectada (o medida) y ha sido marcada con una sustancia marcadora, y genes desconocidos que son desnaturalizados a la cadena única y mezclados en un tampón adecuado, y reasociados para formar un complejo de la sonda de nucleótidos y los genes desnaturalizados a la cadena única. Seguidamente, la solución de la reacción resultante es sometida al método de separación de la presente invención que emplea fuerzas dielectroforéticas como se describió anteriormente para separar el complejo de la sonda de nucleótidos libre. Después de la separación, la sustancia marcadora en el complejo es medida mediante los métodos anteriormente descritos, por lo que es posible detectar o medir si los genes desconocidos contienen la secuencia complementaria para la sonda de nucleótidos, es decir, la presencia o ausencia de la secuencia complementaria para la sonda de nucleótidos.

En los métodos anteriormente mencionados, la sonda de nucleótidos y los tampones pueden ser seleccionados apropiadamente según métodos conocidos por sí mismos. Los métodos para preparar una sonda de nucleótidos son genes desconocidos desnaturalizados para la cadena única, las condiciones de la reasociación y similares pueden ser realizados según métodos conocidos por sí mismos.

La presente invención se describirá adicionalmente en detalle con referencia a los Ejemplos, Ejemplos de Referencia y Ejemplos Experimentales, que no está previsto que limiten en modo alguno la presente invención.

60 Ejemplos

Ejemplo de Referencia 1

Elaboración del sustrato de electrodo dielectroforético

65 Se diseñó una hilera de electrodos múltiples que tenía una separación mínima de 7 μm , un conjunto apilado de electrodos de 20 μm y el número de electrodos de 2016 (1008 pares), y se preparó una fotomáscara según el diseño para elaborar el electrodo como sigue.

ES 2 269 054 T3

En un sustrato de vidrio en el que se depositó aluminio y al que se aplicó un material fotosensible, se extendió un modelo de electrodo diseñado en una máquina de extensión de haces de electrones, y seguidamente se reveló el material fotosensible y al aluminio fue marcado para preparar la fotomáscara.

- 5 El sustrato de electrodo se elaboró según el método descrito por T. Hashimoto, "Illustrative Photofabrication", Sogo-denshi Publication (1985), como sigue.

La fotomáscara así preparada se puso en contacto estrechamente con el sustrato de vidrio con aluminio depositado, al que se aplicó el material fotosensible, y seguidamente se expuso al modelo de electrodo con una lámpara de mercurio.
10 El sustrato del electrodo fue elaborado revelando el sustrato de vidrio expuesto para el electrodo y grabando la superficie de aluminio, seguido de la separación del material fotosensible que permanecía en la superficie de aluminio. La superficie de aluminio, que tenía actividades electroquímicas, fue provista con un revestimiento delgado orgánico que tenía un grosor de 5 nm mediante revestimiento por centrifugado de un material fotosensible diluido.

- 15 Las Figuras 4 y 5 muestran las vistas esquemáticas del sustrato de electrodo elaborado y el electrodo, respectivamente. En la Figura 4, el número 1 indica el electrodo.

Ejemplo de Referencia 2

- 20 *Elaboración de un sustrato de electrodo que tiene una trayectoria de flujo*

Con el fin de separar moléculas por el movimiento de las moléculas bajo un campo eléctrico AC no uniforme, se preparó una trayectoria de flujo en el sustrato del electrodo elaborado en el Ejemplo de referencia 1 usando caucho de silicona.

- 25 La trayectoria de flujo del caucho de silicona para enviar una solución disolvente de moléculas en el electrodo tenía una profundidad de 25 μm y una anchura de 400 μm y estaba diseñada de forma que la trayectoria de flujo discurra a través de una zona en la que estaba colocado el electrodo en el sustrato del electrodo.

- 30 Su elaboración se llevó a cabo según el método descrito por T. Hashimoto, "Illustrative Photofabrication", Sogo-denshi Publication (1985). En primer lugar, un material fotosensible negativo de tipo laminar que tenía un grosor de 25 μm fue aplicado sobre el sustrato de vidrio, expuesto con una fotomáscara diseñada para preparar la trayectoria de flujo, y se reveló el material fotosensible negativo. Se extendió caucho de silicona sin curar usando el sustrato fotosensible negativo como plantilla, y seguidamente se curó para producir una superficie de caucho de silicona que
35 tenía una superficie cóncava con una altura de 25 μm en la zona en la que se colocó el electrodo.

- El sustrato del electrodo y la trayectoria del flujo del caucho de silicona fueron adheridos con un caucho de silicona de curado de tipo de dos fluidos de forma que la superficie cóncava del caucho de silicona estuviera enfrentada a la zona en la que estaba colocado el electrodo en el sustrato eléctrico. Se colocó una jeringuilla para inyectar una solución en
40 dirección ascendente de la trayectoria del flujo, y se añadió un aparato que permitía que una solución en la que estaban disueltas las moléculas fluyera en el electrodo al sustrato del electrodo.

- Las Figuras 6 y 7 muestran las vistas esquemáticas del sustrato del electrodo que tiene la trayectoria de flujo formada y la sección a lo largo de la línea a-a', respectivamente. En la Figura 6, el número 1 indica el electrodo, y la
45 flecha representa la dirección del movimiento de una solución en la que están disueltos dos o más tipos de moléculas.

Ejemplo 1

- 50 *Detección de moléculas de biotina con un aparato de cromatografía dielectroforética (aparato de fraccionamiento de campo-flujo)*

- Se unió biotina a λ -DNA como una sustancia mejoradora de la separación de dielectroforesis para proporcionar λ -DNA biotilado, que se mezcló seguidamente con un anticuerpo anti-biotina marcado con fluoresceína para llevar a cabo la reacción de antígeno-anticuerpo mediante el uso del resultante como una muestra, la detección cuantitativa de
55 moléculas de biotina se llevó a cabo con un aparato de cromatografía dielectroforética.

Reactivos

- El λ -DNA biotilado en el que la biotina se acopló con λ -DNA se preparó usando un estuche de ensayo marcador
60 Photo-Biotin (Nippon Gene Co. Ltd.) según el protocolo de preparación anejo. Los componentes se mezclaron seguidamente a las relaciones mostradas en la Tabla 1 en PBS 50 mM (pH 7,5) para llevar a cabo la reacción de antígeno-anticuerpo. La concentración de λ -DNA total en cada muestra se ajustó a 0,32 nM añadiendo λ -DNA no biotilado, que es igual a la concentración de λ -DNA biotilado en la muestra que tiene una concentración de biotina de 128 nM (Muestra n° 5).

65

ES 2 269 054 T3

TABLA 1

Muestra N°	Concentración de biotina	Anticuerpo anti-biotina marcado con fluoresceína
1	0 nM	5,7 nM
2	0,8 nM	5,7 nM
3	1,6 nM	5,7 nM
4	3,2 nM	5,7 nM
5	128 nM	5,7 nM

Después de que se completó la reacción de antígeno-anticuerpo, el medio de las reacciones fue sustituido con tampón de carbonato 2,5 mM (pH 10) para preparar muestras, usando un filtro de ultrafiltración que tenía un peso molecular de corte de 50000.

Procedimientos

Las soluciones de la reacción anteriormente descritas fueron alimentadas al sustrato del electrodo que tenía la trayectoria de flujo formada en el Ejemplo de Referencia 2 a un caudal de 800 $\mu\text{m/s}$ en el orificio de inyección de la muestra usando una bomba de microjeringuilla (KSD 100, Aishisu Co., Inc.). El campo eléctrico aplicado tenía una frecuencia de 1 MHz y una resistencia del campo eléctrico de 0,9 MV/m (definida como el voltaje aplicado/7 μm de separación mínima).

Las muestras de moléculas anteriormente mencionadas fueron introducidas en el orificio de inyección de muestras en el sustrato del electrodo, y la cantidad de fluorescencia se midió cerca de la salida de la trayectoria de flujo aplicando el campo eléctrico predeterminado durante un período de 30 a 80 segundos después de introducir cada muestra.

Las mediciones se llevaron a cabo tomando imágenes fluorescentes aproximadamente cada cinco segundos en un área de la trayectoria de flujo cerca de la salida de la trayectoria de flujo bajo un microscopio láser confocal (LSM-GB 200, Olympus Optical Co., Ltd.) y calculando la suma de los valores del brillo de todos los píxeles (en lo sucesivo denominada la cantidad fluorescente). En las mediciones, cuando se usaron imágenes confocales perfectas, en el caso de que la distribución de la intensidad fluorescente tuviera lugar con la profundidad de la trayectoria de flujo, no se obtuvieron resultados exactos. Por tanto, el orificio del fotomultiplicador del microscopio láser se abrió completamente con el fin de permitir integrar y medir la fluorescencia dependiendo también de la profundidad.

La relación de captura puede ser calculada a partir de la siguiente ecuación 1.

En estas mediciones, cuando no es aplicado el campo eléctrico, la cantidad de fluorescencia medida a la salida del electrodo es igual a la de la entrada, ya que las muestras que tienen moléculas marcadas con fluorescencia se desplazan en la estructura del electrodo por medio de una bomba de jeringuilla. Sin embargo, cuando el campo eléctrico es aplicado y las moléculas son atraídas hacia el electrodo por fuerzas de dielectroforesis, la cantidad de fluorescencia será disminuida. Por lo tanto, la cantidad disminuida en la cantidad de fluorescencia es tomada como la cantidad capturada de moléculas y usada para indicar la cantidad de moléculas atraídas hacia el electrodo cuando la cantidad total de las moléculas iniciales se considera que es 100.

$$\text{Relación de captura (\%)} = (F_- - F_+) \times 100 / F$$

en la cual

F_- : la cantidad de fluorescencia sin aplicar el campo eléctrico

F_+ : la cantidad de fluorescencia durante la aplicación del campo eléctrico

Resultados

Los resultados se muestran en la Figura 8. A 0,9 MV/m de la resistencia del campo eléctrico empleado en estos experimentos, la relación de captura era aproximadamente 100% para el λ -DNA y 0% para el anticuerpo anti-biotina marcado con fluoresceína. A una concentración de biotina de 0 pM, como no había λ -DNA biotinilado que fuera reconocido por el anticuerpo anti-biotina marcado con fluoresceína, el anticuerpo marcado no fue atrapado en el electrodo, y la relación de captura exhibida fue casi 0%. Es esperado que cuando es añadido el λ -DNA biotinilado, el anticuerpo marcado que forma un complejo con el λ -DNA biotinilado atrapado en el electrodo es también atrapado

ES 2 269 054 T3

en el electrodo, ya que el anticuerpo anti-biotina marcado con fluoresceína está unido a biotina por la reacción de antígeno-anticuerpo. Por lo tanto, la relación de captura indicada en este caso es para representar la relación del anticuerpo unido al λ -DNA biotinilado entre el anticuerpo anti-biotina marcado total que está contenido en la muestra. En concentraciones de biotina de 0 a 3,2 nM, la relación de captura fue aumentada proporcionalmente para aumentar la concentración de biotina, y por tanto se puede decir que el antígeno es detectado cuantitativamente. Por el contrario, para muestras que tienen la concentración de biotina añadida a 3,2 nM o mayores, se encontró poco aumento en la relación de captura y la captura fue del orden de casi 30%. Por esta causa, es probable que el anticuerpo anti-biotina marcado con fluoresceína usado en este Ejemplo tenga un bajo título de anticuerpo, y el anticuerpo capaz de unirse a la biotina estaba presente en tan solo aproximadamente 30% del anticuerpo total.

Hasta ahora, es imposible separar un complejo de biotina y anticuerpo anti-biotina marcado con fluoresceína a partir de un anticuerpo anti-biotina marcado con fluoresceína sin reaccionar por cromatografía dielectroforética y no se ha conseguido la detección de un complejo con biotina, porque no hay diferencia en la separación por dielectroforesis entre el complejo y el anticuerpo sin reaccionar hasta un alcance suficiente. Los resultados anteriormente mencionados indican que las aplicaciones de una sustancia mejoradora de la separación puede permitir detectar cuantitativamente por cromatografía de dielectroforesis las moléculas que no han sido detectadas hasta ahora.

Ejemplo 2

Detección de α -fetoproteína (AFP) con gránulos de látex inmovilizados en anticuerpo como una sustancia mejoradora de la separación

Se hizo reaccionar alfa-fetoproteína (AFP) con gránulos de látex en los que se había inmovilizado anticuerpo anti- α -fetoproteína (AFP) A4-4, y se formó un complejo haciendo reaccionar adicionalmente con un anticuerpo anti-AFP marcado con fluoresceína WA1 Fab' que tenía un epitopo diferente del de A4-4. Se detectó AFP separando el complejo del anticuerpo anti-AFP marcado con fluoresceína sin marcar WA1 en el electrodo.

2-1 Detección de AFP en tampón

Reactivos

Preparación de gránulos de látex inmovilizados en anticuerpo anti-AFP

Se mezclaron 1,2 mg de anticuerpo anti-AFP A4-4 preparado por los inventores y 10 mg de gránulos de látex con un diámetro de 120 nm (látex reactivo N-100, Sekisui Chemical col., Inc.) en una solución de citrato (pH 3) y seguidamente los gránulos se recogieron como precipitados por centrifugación. Los gránulos recogidos se pusieron en suspensión en solución al 2,5% de BSA para bloquear la superficie de los gránulos, produciendo gránulos de látex sobre los que se adsorbió el anticuerpo anti-AFP A4-4. Los gránulos de látex preparados tenían adsorbidos 123 μ g de anticuerpo anti-AFP A4-4 por 1 mg de los gránulos de látex.

Preparación de anticuerpo anti-AFP WA1 Fab' marcado con fluoresceína

Se digirieron 40 mg de anticuerpo anti-AFP WA1 con pepsina, y seguidamente se redujo con 2-aminometanotiol (Wako Pure Chemicals Industries, Ltd.) para preparar 15 mg del Fab'. Se mezclaron 15 mg del anticuerpo anti-AFP WA1 Fab' y 150 μ g de isotiocianato de fluoresceína (Wako Pure Chemicals Industries, Ltd.) en 10 ml de solución de tampón de carbonato (pH 9) y se preparó un anticuerpo anti-AFP WA1 Fab' marcado con fluoresceína usando una columna NAP-25 (Amersham Pharmacia Biotech).

Reacción

La reacción de antígeno-anticuerpo se llevó a cabo mezclando los componentes como se muestra en la Tabla 2 en PBS 50 mM (pH 7,5) y dejando en reposo a temperatura ambiente durante 2 horas.

TABLA 2

Muestra N°	Látex inmovilizado en anticuerpo anti-AFP A4-4	AFP	Anticuerpo anti-AFP marcado con fluoresceína WA1 Fab'
1	0,10%	0 μ M	0,70 μ M
2	0,10%	0,09 μ M	0,70 μ M
3	0,10%	0,18 μ M	0,70 μ M
4	0,10%	0,35 μ M	0,70 μ M

ES 2 269 054 T3

Después de que se completó la reacción de antígeno-anticuerpo, las soluciones de la reacción se diluyeron 100 veces con agua destilada, y las materias resultantes se sometieron a la separación dielectroforética.

Procedimientos

5 En el electrodo dielectroforético descrito en el Ejemplo de Referencia 1 se hicieron gotear 20 μl de las soluciones anteriormente mencionadas, y se colocó un vidrio de recubrimiento que tenía en cada lado 22 mm. Se tomaron imágenes fluorescentes antes y con posterioridad a la aplicación del campo eléctrico usando un microscopio láser confocal. El campo eléctrico aplicado tenía una frecuencia de 100 kHz y una resistencia del campo eléctrico de 1,4 MV/m.

10 Se realizó un análisis de las imágenes fluorescentes usando un software de análisis de imágenes Scion Image. Después de que se hallara el promedio de la graduación de los tonos de colores de las imágenes fluorescentes antes y durante la aplicación del campo eléctrico, la graduación del tono de colores de las imágenes antes de la aplicación del campo eléctrico se sustrajo del obtenido durante la aplicación del campo eléctrico, de forma que solamente fueran indicadas las áreas que tenían una fluorescencia aumentada por la aplicación del campo eléctrico. El densitograma de 15 las áreas que tenían un aumento de fluorescencia se obtuvo para expresar la cantidad aumentada de fluorescencia como valores de concentración de producción de imágenes.

Resultados

20 Como consecuencia de la dielectroforesis en el electrodo, los gránulos se desplazaron hasta una zona débil en la resistencia del campo eléctrico debido a que recibían fuerzas dielectroforéticas negativas, y las demás moléculas biológicas, incluido el anticuerpo anti-AFP WA1 Fab' marcado con fluoresceína sin reaccionar se desplazaron hasta una zona fuerte en la resistencia del campo eléctrico debido a que recibían fuerzas dielectroforéticas positivas, y 25 por lo tanto permitían separar, en el electrodo, el complejo de gránulos de látex inmovilizados en anticuerpo anti-AFP/AFP/anticuerpo anti-AFP WA1 Fab' marcado con fluoresceína del anticuerpo anti-AFP WA1 Fab' marcado con fluoresceína sin reaccionar.

30 La Figura 9 muestra imágenes fluorescentes en el electrodo tomadas desde el microscopio láser antes y durante la aplicación del campo eléctrico, cuando se añadió AFP a 0,35 μM . En las muestras que contenían AFP, la fluorescencia había aumentado en el electrodo de aluminio debido a las fuerzas dielectroforéticas negativas durante la aplicación del campo eléctrico, mientras que en la muestra que no contenía AFP, no se encontraron cambios en las imágenes antes y durante la aplicación del campo eléctrico. Estas imágenes fueron tratadas con Scion Image para obtener densitogramas en zonas de bandas en las que la fluorescencia estaba aumentada, y la cantidad aumentada de fluorescencia se expresó 35 como valores de concentración de producción de imágenes. La Figura 10 muestra la relación entre las concentraciones de AFP y las cantidades aumentadas de fluorescencia.

A partir de los resultados de la Figura 10, se comprenderá que se encuentra una buena respuesta a la dosis entre las concentraciones de AFP añadidas y que los valores de concentración de la producción de imágenes y los de AFP 40 pueden ser detectados cuantitativamente.

2-2 Detección de AFP en suero

Reactivos

45 Se usaron los mismos reactivos que en el apartado 2-1.

Reacción

50 Después de que se prepararon las muestras que tenían los componentes mostrados en la Tabla 2 con suero normal que no contenía AFP, se llevó a cabo la reacción de antígeno-anticuerpo dejando en reposo durante dos horas a temperatura ambiente.

55 Después de que se completó la reacción de antígeno-anticuerpo, las soluciones de la reacción se diluyeron 100 veces con agua destilada y las materias resultantes se sometieron a dielectroforesis.

Procedimientos

60 Los procedimientos se llevaron a cabo análogamente a los del apartado 2-1.

Resultados

65 Los resultados se muestran en la Figura 11. Puede encontrarse a partir de la Figura 11 que se obtiene un buen resultado cuantitativo en el intervalo de la presencia de AFP. A partir de este descubrimiento, se entiende que si se usa suero como las muestras, los componentes en el suero no afectan a la dielectroforesis en gran medida, y se puede conseguir la detección de una proteína que va a ser medida en suero.

ES 2 269 054 T3

A partir de estos resultados, el uso de una sustancia que tenga dielectroforesis negativa, como gránulos de látex, como una sustancia mejoradora de la separación, permite separar en el electrodo dielectroforético un componente biológico que tiene dielectroforesis positiva, y permitirá separar y detectar cuantitativamente una proteína al nivel molecular, lo que era imposible hasta ahora.

5

Ejemplo 3

Detección de λ -DNA con gránulos de látex unidos una sonda de DNA como sustancia mejoradora de la separación

10 *Reactivos*

Preparación de gránulos de látex inmovilizados en sonda de DNA de 2 kb

15 Con el fin de preparar gránulos de estreptavidina para fijar una sonda de DNA, se inmovilizó estreptavidina en gránulos de látex carboxilados con un diámetro de 2 μm (Polysciences, Inc.) usando un estuche de ensayo de carbo-diimida para micropartículas caboxiladas (Polysciences, Inc.). Como la sonda de DNA se usó un producto obtenido amplificando 2 kb de una secuencia casi media de λ -DNA por PCR usando un cebador de 5'-CTATGACTGTACGC CACTGTCC-3' marcada con 5'-biotina y un cebador de 5'-CAATCACCAACCCAGAAAACAATG-3'. El producto se hizo reaccionar con los gránulos inmovilizados en estreptavidina para preparar gránulos de látex inmovilizados en 20 DNA de 2 kb.

25 Los gránulos de látex inmovilizados en DNA de 2 kb preparados se mantuvieron en reposo en NaOH 0,3 N durante 5 minutos para desnaturalizar el DNA de 2 kb hasta cadenas únicas. Después de que los gránulos fueron precipitados por centrifugación, los gránulos se volvieron a poner en suspensión en NaOH 0,3 N. Se añadió solución de HCl a la concentración final de 0,3 N para neutralizar, para preparar gránulos de látex inmovilizados en sonda de DNA de 2 kb.

Marcado y desnaturalización a cadenas únicas de λ -DNA y T7 DNA

30 Se marcaron lambda-DNA y T7 DNA en una secuencia diferente de λ -DNA con fluoresceína (fluorescencia verde) y Cy3 (fluorescencia roja; Molecular Probes, Inc.), respectivamente, usando un estuche de ensayo marcador de ácidos nucleicos Label IT. Los DNA marcados fueron desnaturalizados a cadenas únicas dejándolos en reposo a temperatura ambiente durante 5 minutos en NaOH 0,3 N, y seguidamente fueron neutralizados añadiendo solución de HCl hasta la concentración final de 0,3 N.

35 *Reacción de hibridación*

40 En un tampón SSC, se añadieron 0,05% (p/v) de los gránulos de látex inmovilizados en sonda de DNA de 2 kb al T7 λ -DNA y T7 DNA de cadena única marcados hasta la concentración final de 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$, y la hibridación se llevó a cabo a 68°C durante 18 horas. La solución de la muestra después de la reacción de hibridación se diluyó 100 veces con agua destilada, y se sometió a dielectroforesis.

Procedimientos

45 Los procedimientos se llevaron a cabo análogamente a los del apartado 2-1, con la excepción de que se empleó un campo eléctrico que tenía una frecuencia de 3 MHz y una resistencia del campo eléctrico de 0,9 MV/m.

Resultados

50 Los resultados se muestran en la Figura 12.

55 Cuando se observó la solución después de la hibridación bajo un microscopio de fluorescencia, solamente se observó en los gránulos la fluorescencia de Cy3 con el que había sido marcado el λ -DNA. Cuando el campo eléctrico fue aplicado después de que esta solución se hizo gotear sobre el electrodo dielectroforético, los gránulos de látex recibieron fuerzas dielectroforéticas negativas y se desplazaron hasta una zona débil en la resistencia del campo eléctrico, de forma que la fluorescencia de λ -DNA marcado con Cy3 se unió a los gránulos unidos a sonda de DNA de 2 kb fue observada en una zona débil en una resistencia del campo eléctrico débil. Por el contrario, la fluorescencia de T7 DNA marcado con fluoresceína no unido a los gránulos inmovilizados en sonda de DNA de 2 kb fue observada en una zona del borde del electrodo, debido al movimiento hacia una zona fuerte en la resistencia del campo eléctrico por dielectroforesis positiva. Por tanto, este ejemplo demuestra que el uso de gránulos de látex como una sustancia mejoradora de la separación dielectroforética permitirá separar y detectar una molécula específica de DNA entre muchas especies moleculares.

65 A partir de estos resultados, se comprende que una sustancia mejoradora de la separación dielectroforética es útil en una separación dielectroforética para la detección de una sustancia.

Ejemplo Experimental 1

*Observación de moléculas en el electrodo*5 (1) *Observación de moléculas de DNA*

Como muestras de DNA se usó 1 ml de una solución en agua ultrapura que contenía 0,001 mg de λ -DNA (48,5 kb, de doble cadena), que fue marcado con un reactivo fluorescente YO-PRO-1 (una marca registrada de la empresa Molecular Probes, Inc.) según el método descrito por R. P. Hogland, "Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, 6th Edición, Molecular Probes, Inc. (1996) y 1 ml de solución en agua ultrapura que contenía 0,001 mg de un oligonucleótido (22 bases, DNA de cadena única, preparado por los inventores), que fue marcada en la posición terminal con un colorante fluorescente de fluoresceína cuando fue sintetizado como un DNA corto mediante un método habitual, respectivamente.

15 Con el fin de examinar si las moléculas de DNA experimentan o no dielectroforesis en el sustrato de electrodo elaborado en el Ejemplo de Referencia 1, se hicieron gotear 10 μ l de las muestras respectivas de DNA anteriormente descritas (el λ -DNA marcado y el oligonucleótido) sobre el sustrato del electrodo, y la fluorescencia de las muestras de DNA se observó bajo un microscopio de fluorescencia aplicando gradualmente al electrodo un voltaje AC con una frecuencia de 1 MHz.

20 Se observó que el λ -DNA comenzó a acumularse en una posición de campo eléctrico fuerte por dielectroforesis a aproximadamente 500 kV/m de resistencia del campo eléctrico en la separación mínima entre los electrodos. Sin embargo, a esta resistencia del campo eléctrico, no se observó que el oligonucleótido se acumulara en una posición del campo eléctrico fuerte por dielectroforesis.

25 (2) *Observación de las moléculas de proteínas*

Se usaron como muestras de proteínas una solución en agua ultrapura que contenía 0,1 mg de IgM (peso molecular de aproximadamente 900 kDa), que fue marcada con un reactivo fluorescente FITC (isotiocianato de fluoresceína, Wako Pure Chemicals Industries, Ltd.) según el método descrito por H. Maeda, Journal of Biochemistry, 65, 777 (1969) y una solución en agua ultrapura que contenía 0,1 mg de BSA (peso molecular, aproximadamente 65 kDa), que fue marcado con un reactivo fluorescente TRITC (isotiocianato de tetrametil-rodamina, Wako Pure Chemicals Industries, Ltd.) según el método descrito por H. Maeda, Journal of Biochemistry, 65, 777 (1969), respectivamente.

35 Con el fin de examinar si las moléculas de proteínas experimentan o no dielectroforesis en el sustrato del electrodo, se hicieron gotear 10 μ l de las respectivas muestras de proteínas anteriormente descritas (la IgM marcada y BSA) sobre el sustrato del electrodo, y se observó la fluorescencia en las muestras de DNA bajo un microscopio de fluorescencia aplicando gradualmente al electrodo un voltaje AC con una frecuencia de 1 MHz.

40 Se observó que la IgM marcada con FITC comenzó a acumularse en una posición del campo eléctrico fuerte a aproximadamente 1,0 MV/m de la resistencia del campo eléctrico en la separación mínima en el electrodo. Sin embargo, a esta resistencia del campo eléctrico, se observó claramente que el BSA marcado con TRITC se asociaba a una posición del campo eléctrico fuerte por dielectroforesis.

45 Ejemplo Experimental 2

*Análisis de moléculas con el sustrato de electrodo que tiene una trayectoria de flujo**Reactivos*

50 Como muestras de moléculas se usaron el λ -DNA marcado y las soluciones de oligonucleótidos usadas en el Ejemplo Experimental 1.

Procedimientos

55 Las soluciones de moléculas anteriormente descritas fueron alimentadas al sustrato de electrodo que tenía la trayectoria de flujo elaborado en el Ejemplo de Referencia 2 a un caudal de 800 m/s en el orificio de inyección de la muestra usando una bomba de microjeringuillas (KSD 100, Aishisu Co., Inc.). El campo eléctrico aplicado tenía una frecuencia de 1 MHz y resistencias del campo eléctrico de unos centenares de kV/m a unos pocos MV/m (definido como el voltaje aplicado/7 μ m de la separación mínima).

60 Cada muestra de molécula (10 μ g/ml del λ -DNA marcado o 0,56 pg/ml del oligonucleótido marcado) fue introducida en el orificio de inyección de muestras en el sustrato del electrodo, y la cantidad de fluorescencia se midió cerca de la salida de la trayectoria de flujo con la aplicación del campo eléctrico predeterminado durante un período de 30 a 65 80 segundos después de introducir cada muestra.

Las mediciones se llevaron a cabo tomando imágenes fluorescentes aproximadamente cada cinco segundos en la trayectoria de flujo cercana a la salida de la trayectoria de flujo usando un microscopio láser confocal (LSM-GB

200, Olympus Optical Col, Ltd.) y calculando la suma de los valores del brillo de todos los píxeles (en lo sucesivo denominada la cantidad de fluorescencia). En las mediciones, cuando se usaron imágenes confocales perfectas, en el caso de que la distribución de la intensidad fluorescente tuviera lugar con la profundidad de la trayectoria de flujo, no se obtuvieron resultados exactos. Por tanto, el orificio del fotomultiplicador del microscopio láser estuvo completamente abierto con el fin de permitir integrar y medir la fluorescencia dependiendo también de la profundidad.

La relación de captura se calculó a partir de la ecuación 1 anteriormente descrita.

En estas mediciones, cuando no se aplica el campo eléctrico, la cantidad de fluorescencia medida a la salida del electrodo es igual a la de la entrada, ya que las muestras de molécula marcada con fluorescencia se desplazaba en la estructura del electrodo por medio de la bomba de jeringuilla. Sin embargo, cuando el campo eléctrico es aplicado y las moléculas son atraídas hacia el electrodo por fuerzas dielectroforéticas, la cantidad de fluorescencia será disminuida. Por lo tanto, la cantidad disminuida en la cantidad de fluorescentes es tomada como la cantidad capturada de moléculas y es usada para indicar la cantidad de moléculas atraídas hacia el electrodo cuando la cantidad total de las moléculas iniciales se considera que es 100.

Resultados

La Figura 13 muestra el transcurso del tiempo de la cantidad de fluorescencia a la salida de la trayectoria de flujo, cuando se usó la solución de λ -DNA marcado y el campo eléctrico aplicado tenía una resistencia del campo eléctrico de 0,60 o 1,04 MV/m. La Figura 14 muestra el transcurso del tiempo de la cantidad de fluorescencia a la salida de la trayectoria de flujo, cuando se usó la solución de oligonucleótido marcado y el campo eléctrico aplicado tenía una resistencia del campo eléctrico de 1,4 MV/m. En la Figura 13, los resultados bajo la resistencia del campo eléctrico aplicado de 0,60 MV/m son indicados mediante círculos abiertos, y los resultados bajo 1,04 MV/m mediante círculos cerrados.

Como se muestra en la Figura 13, se reconoce que cuando se usó la solución de λ -DNA marcada y el campo eléctrico aplicado tenía una resistencia del campo eléctrico de 1,04 MV/m, la cantidad de fluorescencia a la salida de la trayectoria de flujo se redujo hasta aproximadamente cero, ya que el campo eléctrico era suficientemente fuerte y todo el λ -DNA fue capturado en el electrodo. Un aumento transitorio en la cantidad de fluorescencia después de 80 segundos es debido al cese del campo eléctrico, dando lugar a la liberación de las moléculas de DNA que se habían acumulado en el electrodo hasta entonces, y proporcionando así transitoriamente una mayor cantidad de fluorescencia que la del estado inicial. Después de que el DNA capturado haya sido liberado, la cantidad de fluorescencia se hizo volver al nivel inicial. Un modelo similar pudo ser reconocido también cuando se usó la solución de λ -DNA marcado y el campo eléctrico aplicado tenía una resistencia del campo eléctrico de 0,60 MV/m. Sin embargo, debe entenderse que la cantidad de fluorescencia no estaba reducida a cero durante la aplicación del campo eléctrico (durante el período de 30 a 80 segundos), dicho de otro modo, el DNA no fue completamente capturado debido a que la resistencia del campo eléctrico no era suficiente. Adicionalmente, aunque el λ -DNA fue fuertemente capturado en una posición del campo eléctrico fuerte a una resistencia del campo eléctrico de 0,5 MV/m en el Ejemplo Experimental 1, debe entenderse en estos experimentos que cuando se va a obtener una capacidad similar para capturar DNA en el electrodo, es necesario proporcionar una resistencia del campo eléctrico más fuerte que sin el flujo en la trayectoria de flujo, porque es añadida la resistencia que resulta del flujo.

Como se muestra en la Figura 14, debe entenderse que cuando se usó la solución de oligonucleótido marcado y el campo eléctrico aplicado tenía una resistencia del campo eléctrico de 1,4 MV/m, no se observó ninguna disminución en la cantidad de fluorescencia, es decir, el oligonucleótido no fue capturado en absoluto a esta resistencia del campo eléctrico.

Estos resultados sugieren que el λ -DNA y un oligonucleótido pueden ser separados uno de otro usando el método de separación de la presente invención.

Ejemplo 4

Separación de moléculas de DNA en soluciones

Los componentes respectivos fueron separados de las soluciones en de λ -DNA (48,5 kb, doble cadena) y un oligonucleótido (22 bases, DNA de cadena única).

Muestras

Se llevaron a cabo mediciones preliminares de la intensidad de la fluorescencia para confirmar que 5 μ g/ml de λ -DNA (48,5 kb, doble cadena) marcado con un reactivo fluorescente YO-PRO-1 y 2,3 pg/ml de un oligonucleótido (22 bases, DNA de cadena única) marcado con fluoresceína reactiva fluorescente en la posición terminal en la síntesis como un DNA de cadena corte emiten la misma cantidad de fluorescente uno y otro. Como muestras se usaron soluciones en agua ultrapura que contenían el oligonucleótido marcado y el λ -DNA marcado a concentraciones dadas, como se muestra en la siguiente Tabla 3, basada en este resultado.

TABLA 3

Muestra N°	Relación de mezcla de oligonucleótido: λ -DNA	Concentración de oligonucleótido marcado	Concentración de λ -DNA marcado
1	0:1	0 pg/ml	10 μ g/ml
2	1:1	2,3 pg/ml	5 μ g/ml
3	5:1	2,3 pg/ml	1 μ g/ml
4	1:0	2,3 pg/ml	0 μ g/ml

Procedimientos

Las muestras fueron alimentadas al sustrato de electrodo que tenía la trayectoria de flujo elaborado en el Ejemplo de Referencia 2 a un caudal de 800 μ m/s en el orificio de inyección de muestras usando una bomba de microjeringuilla (KSD 100, Aishisu Co., Inc.). El campo eléctrico aplicado tenía una frecuencia de 1 MHz y una resistencia del campo eléctrico de 0,86 MV/m o 1,02 MV/m, y el campo eléctrico predeterminado fue aplicado durante un período de 30 a 80 segundos después de la inyección de la muestra para medir las cantidades de fluorescencia del λ -DNA marcado cerca de la salida de la trayectoria de flujo. Las mediciones y la determinación de la relación de captura se llevaron a cabo como en el Ejemplo Experimental 2.

Resultados

Los resultados se muestran en la Figura 15, en la que los resultados de la muestra que tenía una relación de mezcla de 0:1 del oligonucleótido marcado y λ -DNA está indicada mediante círculos abiertos, los resultados de la muestra que tiene una relación de mezcla de 1:1 mediante cuadrados abiertos, los resultados de la muestra que tiene una relación de mezcla de 5:1 mediante + y los resultados de la muestra que tiene una relación de mezcla de 1:0 mediante x.

En este Ejemplo, teniendo en cuenta el acontecimiento en el que todo el λ -DNA capturado y el oligonucleótido no es capturado en absoluto, la relación de captura es igual al porcentaje de la cantidad de fluorescencia derivada del λ -DNA ocupado en la cantidad de fluorescencia de una muestra completa. Es decir, la Muestra 1 (una muestra que tiene una relación de mezcla de 0:1 del oligonucleótido marcado y λ -DNA) debe proporcionar una relación de captura de 100%, la Muestra 2 (una muestra que tiene una relación de mezcla de 1:1 del oligonucleótido marcado y λ -DNA) debe proporcionar una relación de captura de $1/(1+1)=50\%$, la Muestra 3 (una muestra que tiene una relación de mezcla de 5:1 del oligonucleótido marcado y λ -DNA) debe proporcionar una relación de captura de $1/(1+5)=16,7\%$, y la Muestra 4 (una muestra que tiene una relación de mezcla de 1:0 del oligonucleótido marcado y λ -DNA) debe proporcionar una relación de captura de 0%.

A partir de los resultados mostrados en la Figura 15, debe entenderse que, cuando el campo eléctrico aplicado tiene una resistencia del campo eléctrico de 0,86 MV/m, la relación de captura del λ -DNA (Muestra 1) era 53% y el oligonucleótido (Muestra 4) no fue capturado en absoluto. Adicionalmente, para la Muestra 2 (una muestra de λ -DNA a oligonucleótido = 1:1), la relación de captura obtenida fue la mitad del valor anteriormente mencionado, un poco más de 20%, y para la Muestra 3 (una muestra de λ -DNA a oligonucleótido = 1:5), la relación de captura obtenida fue un poco menor que 10%. Debe entenderse que estas relaciones de captura son casi congruentes con los valores teóricos calculados a partir de 53% de la relación de captura de la Muestra 1 (Muestra 2, $53\% \div 1(1+1) = 26,5\%$; Muestra 3, $53\% \div 1(1+5) = 8,8\%$).

Cuando el campo eléctrico aplicado tenía una resistencia del campo eléctrico de 1,02 MV/m, debe entenderse que se obtuvo un 100% de la relación de captura para el λ -DNA solo (Muestra 1) y no se obtuvo ninguna captura para el oligonucleótido solo (Muestra 4). Debe entenderse también que la Muestra 2 proporcionó una relación de captura de 60% y la Muestra 3 proporcionó una relación de captura de aproximadamente 20%, y estas relaciones de captura son casi congruentes con los respectivos valores teóricos, 50% y 16,7%. Debe entenderse a partir de esto que el λ -DNA y un oligonucleótido pueden ser separados uno de otro en un tiempo corto de unas pocas decenas de segundos según el método de la presente invención.

Debe entenderse a partir de estos resultados que pueden ser separados dos o más tipos de moléculas unos de otros con combinaciones de una molécula que va a ser separada y molécula(s) coexistente(s) seleccionando una resistencia del campo eléctrico apropiada.

ES 2 269 054 T3

Ejemplo 5

Separación de moléculas de proteínas en soluciones

5 Los componentes respectivos fueron separados de soluciones en IgM (peso molecular de aproximadamente 900 kDa) y BSA (peso molecular de aproximadamente 65 kDa).

Muestras

10 Como muestras se usaron soluciones en agua superpura que contenían 0,1 mg/ml de IgM (peso molecular de aproximadamente 900 kDa) marcada con un reactivo fluorescente FITC y 0,1 mg/ml de BSA (peso molecular de aproximadamente 65 kDa) marcado con un reactivo fluorescente TRITC.

Procedimientos

15 Los procedimientos se llevaron a cabo análogamente a los del Ejemplo 1, con la excepción de que se empleó un caudal de 400 $\mu\text{m/s}$ y una resistencia del campo eléctrico aplicado de 1,42, 1,78 o 2,14 MV/m, y las cantidades de fluorescencias de IgM y BSA marcadas fueron medidas simultáneamente para determinar las respectivas relaciones de captura.

Resultados

20 Los resultados se muestran en la Figura 16, en la que las relaciones de captura de las IgM y BSA capturadas están indicadas por círculos abiertos y círculos cerrados, respectivamente.

25 A partir de los resultados mostrados en la Figura 16, debe entenderse que tanto para IgM como para BSA, la relación de captura fue aumentada con resistencias del campo eléctrico crecientes, y a una resistencia del campo eléctrico de 2,14 MV/m, la relación de captura fue de aproximadamente 68,5% para IgM y 38% para BSA y, por tanto, hay una clara diferencia en la relación de captura según la diferencia de peso molecular.

30 Aunque las moléculas de proteínas no pudieron ser capturadas completamente a la resistencia del campo eléctrico empleada en este Ejemplo, es fácilmente esperado que la separación de IgM de BSA puede ser conseguida extendiendo adicionalmente la zona de separación del electrodo ya que se encuentra una diferencia significativa en la relación de captura según la diferencia de peso molecular. Esto sugiere que el método de la presente invención permite la separación también según la diferencia de tamaño en el nivel molecular de las proteínas.

Ejemplo 6

Separación B/F después de la reacción de antígeno-anticuerpo

40 Las moléculas de complejo de λ -DNA marcado con biotina/anticuerpo anti-biotina marcado con fluoresceína y anticuerpo anti-biotina marcado con fluoresceína libre no unidas a λ -DNA marcado con biotina fueron separadas unas de otras a partir de soluciones obtenidas mezclando λ -DNA marcado con biotina y anticuerpo anti-biotina marcado con fluoresceína, seguido de la reacción de antígeno-anticuerpo.

Muestras

45 Se preparó λ -DNA marcado con biotina con estuche de ensayo de marcado Photo-Biotin (Nippon Geno Co., Ltd.) según el protocolo de preparación anejo, y seguidamente los componentes fueron mezclados con PBS 50 mM (pH 7,5) a relaciones como se muestra en la Tabla 4 para llevar a cabo la reacción de antígeno-anticuerpo. Después de que se completó la reacción de antígeno-anticuerpo, el medio fue sustituido con tampón de carbonato (pH 10) usando un filtro de ultrafiltración que tenía un peso molecular de corte de 50000 para preparar muestras.

50 La concentración de 21 $\mu\text{g/ml}$ de anticuerpo anti-biotina marcado con fluoresceína (Cosmo Bio Co. Ltd.) tenía moles de biotina iguales a los de 10 $\mu\text{g/ml}$ de λ -DNA marcado con biotina.

60

65

TABLA 4

Muestra N°	Concentración de λ -DNA marcado con biotina	Concentración de anticuerpo anti-biotina marcado con fluoresceína	Concentración de λ -DNA sin marcar
1	0 $\mu\text{g/ml}$	21 $\mu\text{g/ml}$	10 $\mu\text{g/ml}$
2	2,5 $\mu\text{g/ml}$	21 $\mu\text{g/ml}$	7,5 $\mu\text{g/ml}$
3	5 $\mu\text{g/ml}$	21 $\mu\text{g/ml}$	5 $\mu\text{g/ml}$
4	10 $\mu\text{g/ml}$	21 $\mu\text{g/ml}$	0 $\mu\text{g/ml}$

Procedimientos

La resistencia del campo eléctrico era de 1,07 MV/m y los procedimientos se llevaron a cabo análogamente a los del Ejemplo 2. Se midieron las cantidades de fluorescencias del anticuerpo anti-biotina marcado con fluoresceína en las moléculas complejas y el anticuerpo anti-biotina marcado con fluoresceína libre para determinar la relación de captura.

Resultados

Los resultados se muestran en la Figura 17. Como se muestra a partir de los resultados en la Figura 17, debe entenderse que la relación de captura de la molécula compleja era 36% para una concentración de biotina- λ -DNA de 10 $\mu\text{g/ml}$, 8,9% para 2,5 $\mu\text{g/ml}$ y 6% para 0 $\mu\text{g/ml}$ y, por tanto, la relación de captura es disminuida con concentraciones decrecientes de λ -DNA marcado con biotina. Bajo condiciones dielectroforéticas suficientes para capturar el λ -DNA a 100% cuando se aplicó λ -DNA sin marcar de la Muestra 1, la relación de captura fue de 6% mientras que la aplicación de λ -DNA marcados de las Muestras 2, 3 y 4 proporcionó una relación de captura significativamente mayor. Por lo tanto, debe entenderse que la separación de moléculas complejas que resultan de la reacción de antígeno-anticuerpo de anticuerpo anti-biotina marcado con fluoresceína y λ -DNA marcado con biotina del anticuerpo anti-biotina marcado con fluoresceína libre no unido a λ -DNA sin marcar se puede realizar con algo de dependencia de la concentración.

Efecto ventajoso de la invención

Como se mencionó anteriormente, según el primer método de la presente invención, dos o más tipos de moléculas disueltas en una solución en la que no había sido posible una separación hasta ahora, han sido satisfactoriamente separados unos de otros por primera vez con fuerzas dielectroforéticas, mediante un método de formación de una sustancia compleja que contiene una sustancia mejoradora de la separación, lo cual no había sido llevado a cabo en el pasado. Por tanto, la presente invención supone un gran avance como invención.

Adicionalmente, el segundo método de la presente invención es el primer método mediante el cual dos o más tipos de moléculas disueltas en una solución en la cual no había sido posible una separación hasta ahora, han sido satisfactoriamente separados unos de otros usando fuerzas dielectroforéticas bajo un campo eléctrico fuerte que no había sido empleado en el pasado.

Según la presente invención, las respectivas moléculas pueden ser rápida y fácilmente separadas de una solución en la que están disueltos dos o más tipos de moléculas, como moléculas de componente biológicos, por ejemplo, DNA y proteínas, que no habían podido ser separadas hasta ahora mediante fuerzas dielectroforéticas.

REIVINDICACIONES

5 1. Un método para separar una sustancia compleja de una “molécula específica” en una muestra y una “sustancia capaz de cambiar propiedades dielectroforéticas de la molécula específica” que se une a la “molécula específica” de moléculas distintas de la “molécula específica” en la muestra, que comprende

- formar la sustancia compleja de la “molécula específica” y la “sustancia capaz de cambiar propiedades dielectroforéticas de la molécula específica”,

10 **caracterizado** por las etapas de

- aplicar la mezcla de reacción resultante que contiene la sustancia compleja a una dielectroforesis usando un campo eléctrico no uniforme, y

15 - separar la sustancia compleja de las moléculas distintas de la “molécula específica” mediante fuerzas dielectroforéticas.

2. El método de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente las etapas de

20 - medir la “molécula específica” en la sustancia compleja separada o una molécula distinta de la “molécula específica” en la muestra, y

- determinar la cantidad de un componente en la muestra sobre la base del resultado de la medición.

25 3. El método según la reivindicación 2, en el que cada uno de los componentes en la “molécula específica” es una “molécula que va a ser medida”.

30 4. El método de la reivindicación 2, en el que la muestra que contiene la “molécula específica” es puesta en contacto con una “molécula específica marcada por una sustancia marcadora” y la “sustancia capaz de cambiar propiedades dielectroforéticas de la molécula específica” que se une a la “molécula específica” para formar una sustancia compleja marcada de la “molécula específica marcada por la sustancia marcadora” y la “sustancia capaz de cambiar propiedades dielectroforéticas de la molécula específica”, y que comprende las etapas de

35 - aplicar la mezcla de reacción resultante que contiene la sustancia compleja marcada a dielectroforesis usando un campo eléctrico no uniforme,

- separar la sustancia compleja marcada de la “molécula específica marcada por la sustancia marcadora” que no está involucrada en la formación de la sustancia compleja,

40 - medir la “molécula específica marcada por la sustancia marcadora” en la sustancia compleja marcada separada o la “molécula específica marcada por la sustancia marcadora” que no está involucrada en la formación de la sustancia compleja, y

45 - determinar una cantidad del componente en la muestra sobre la base del resultado de la medición.

5. El método según una de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la muestra que contiene la “molécula específica” es una muestra derivada de un cuerpo vivo, o un material tratado de la muestra derivada del cuerpo.

50 6. El método según una de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la “sustancia capaz de cambiar propiedades dielectroforéticas de la molécula específica” es una sustancia que puede proporcionar a la “molécula específica” propiedades dielectroforéticas, sobre la base de que la “molécula específica” puede ser separada de las moléculas distintas de la “molécula específica” contenida en la muestra por dielectroforesis, uniéndose a la “molécula específica”.

55 7. El método según una de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la “sustancia que se une a la molécula específica” es una sustancia que se une a la molécula específica mediante una reacción de “antígeno”-“anticuerpo”, una reacción “cadena de azúcar”-“lecitina”, una reacción de “enzima”-“inhibidor”, una reacción de “proteína”-“péptido”, o una reacción de “cromosoma o cadena de nucleótido”-“cadena de nucleótido”.

FIG. 1

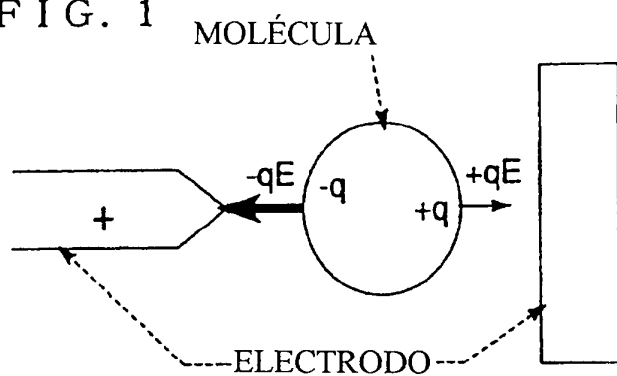


FIG. 2

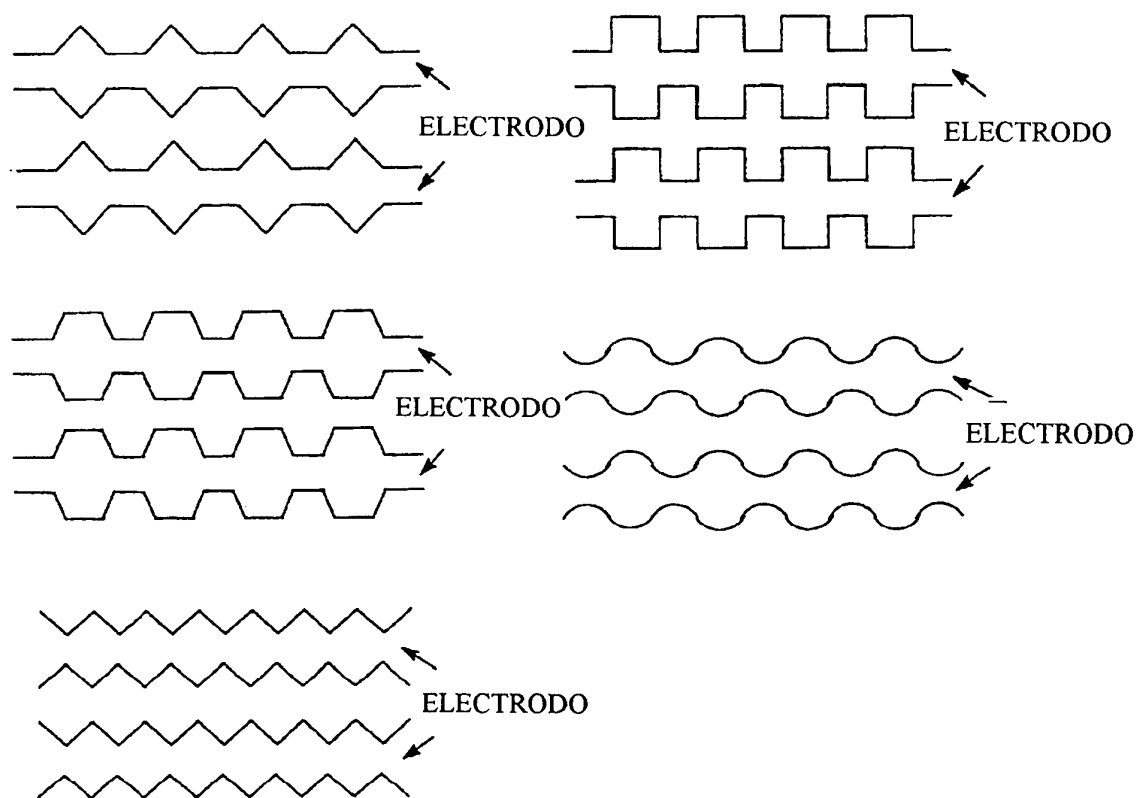


FIG. 3

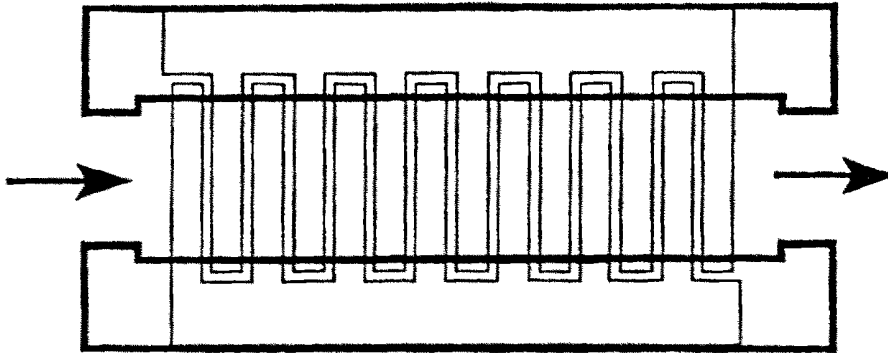


FIG. 4

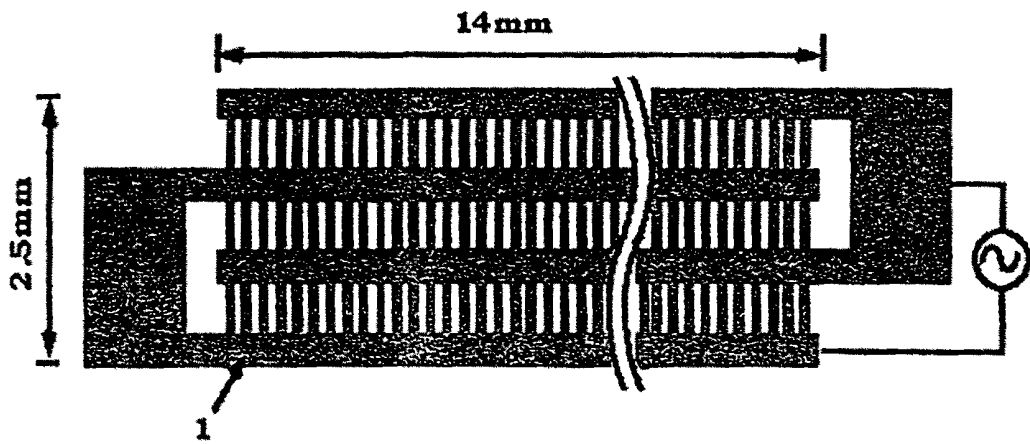


FIG. 5

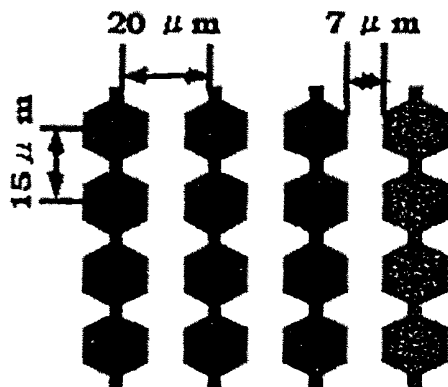


FIG. 6

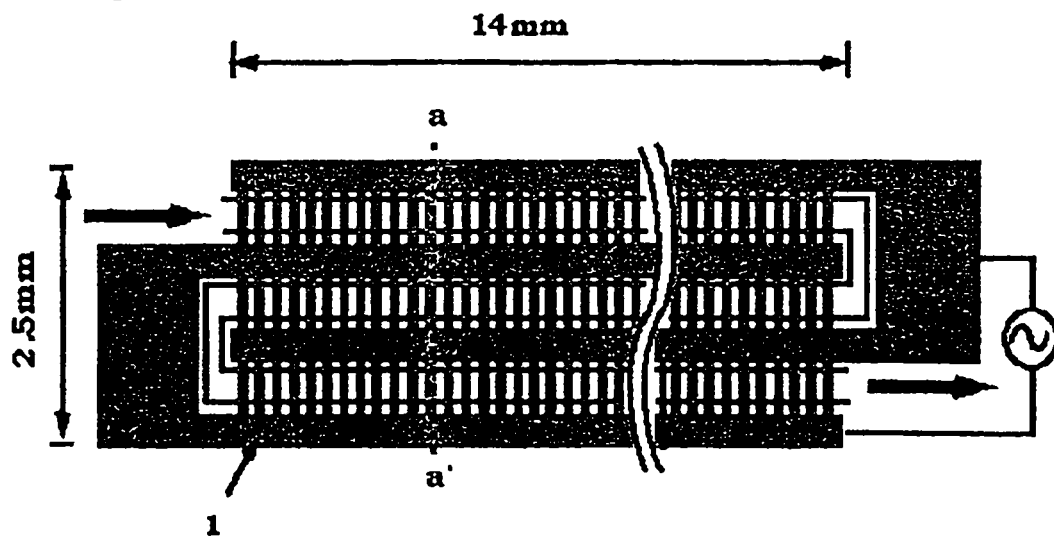


FIG. 7

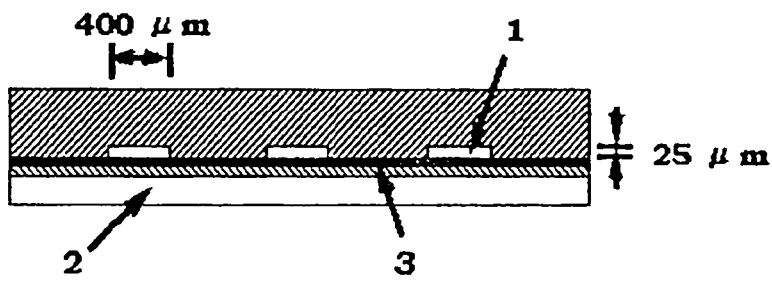


FIG. 8

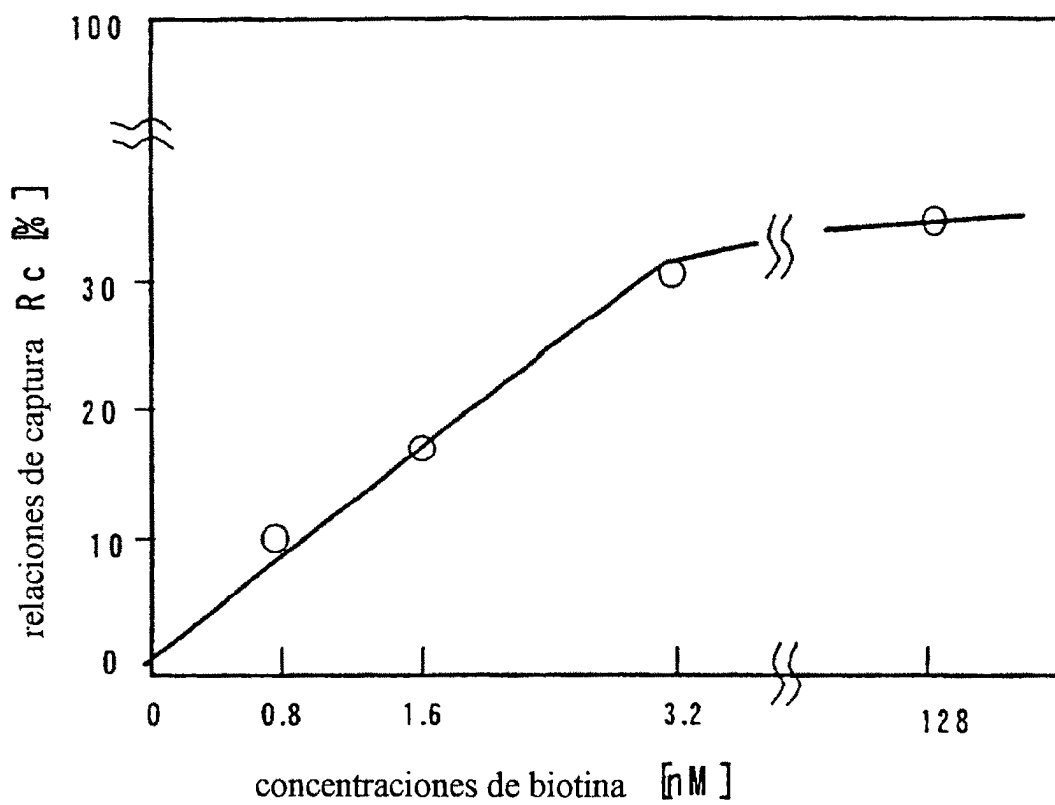
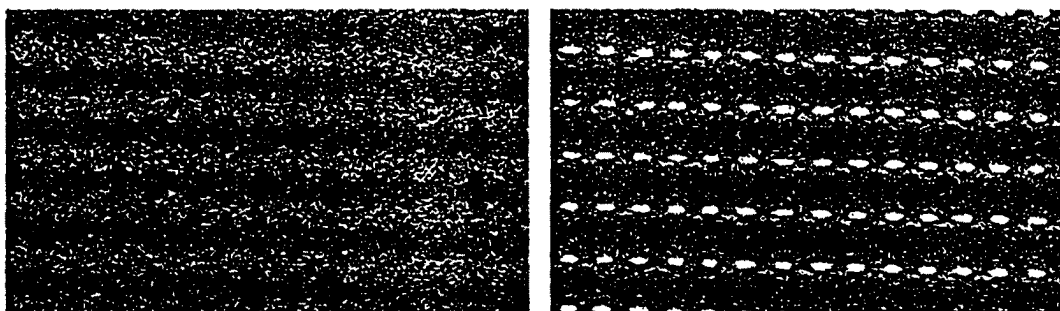


FIG. 9



antes de aplicar un campo eléctrico

aplicando un campo eléctrico

FIG. 10

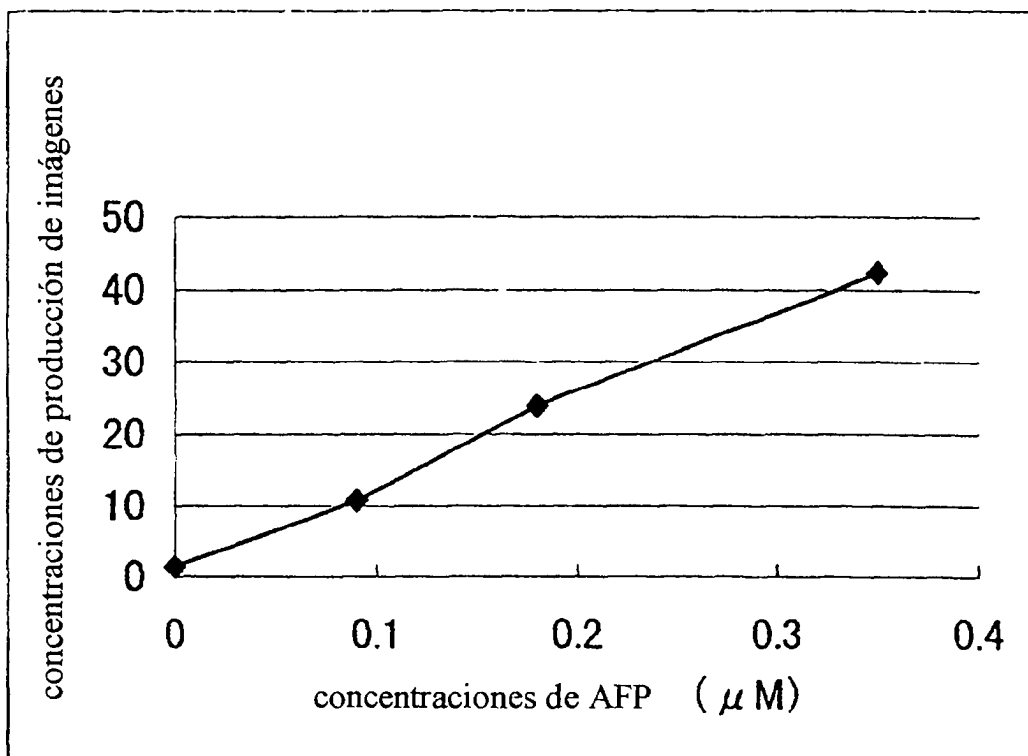


FIG. 11

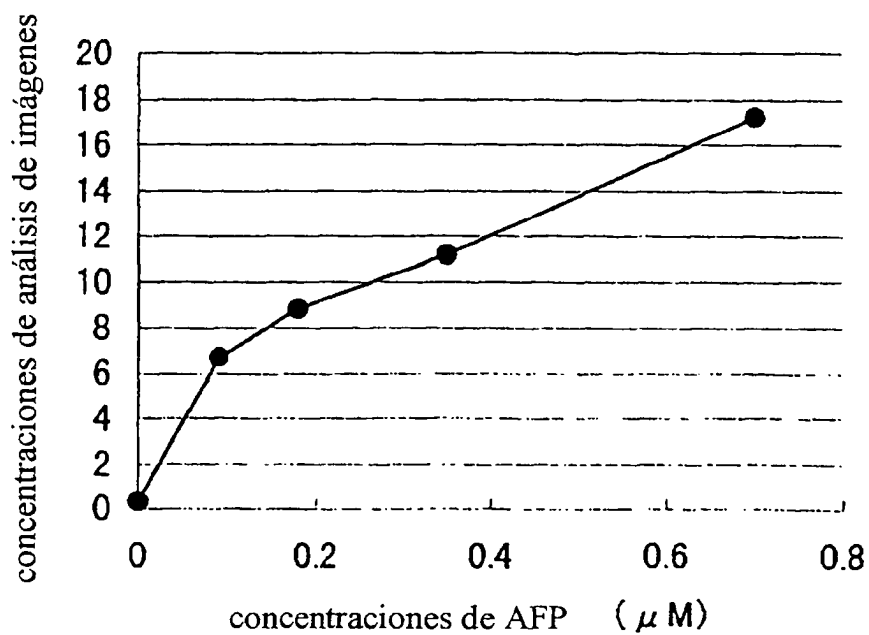


FIG. 12

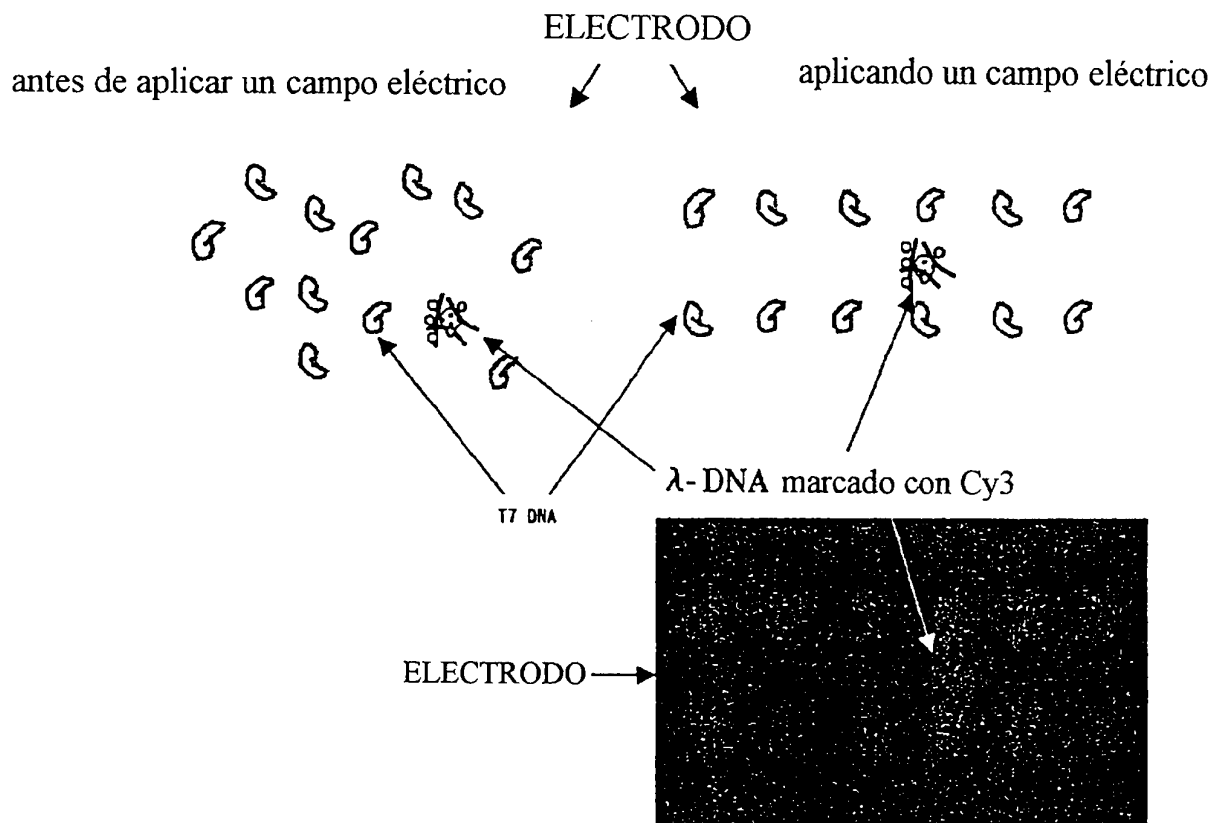
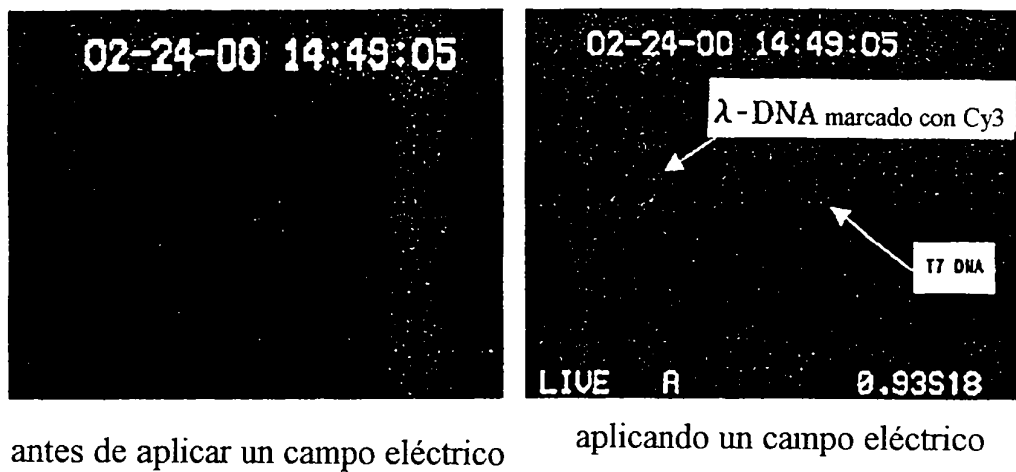


FIG. 13

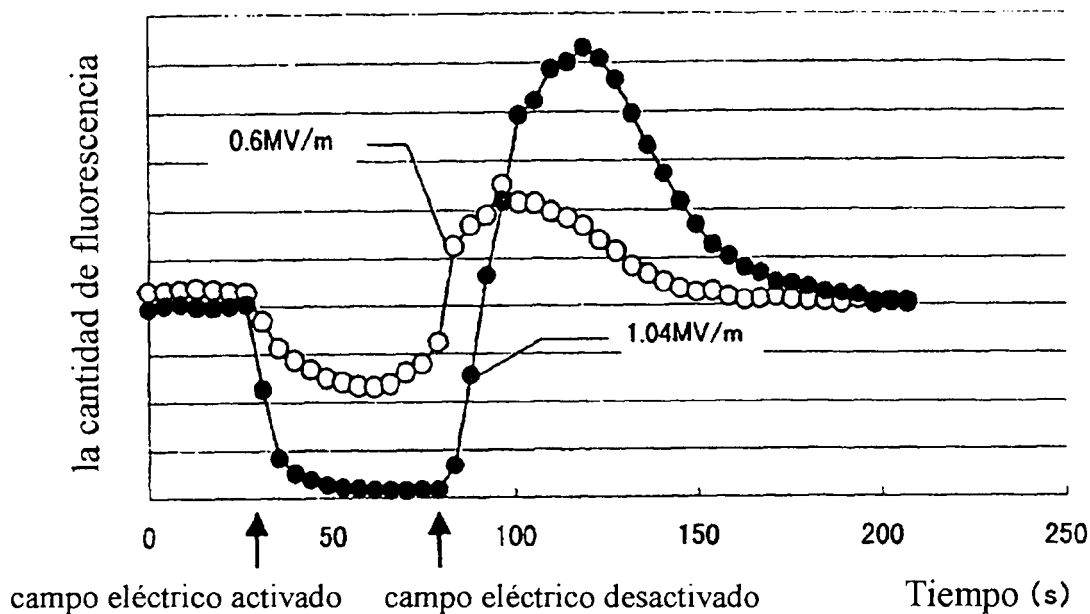


FIG. 14

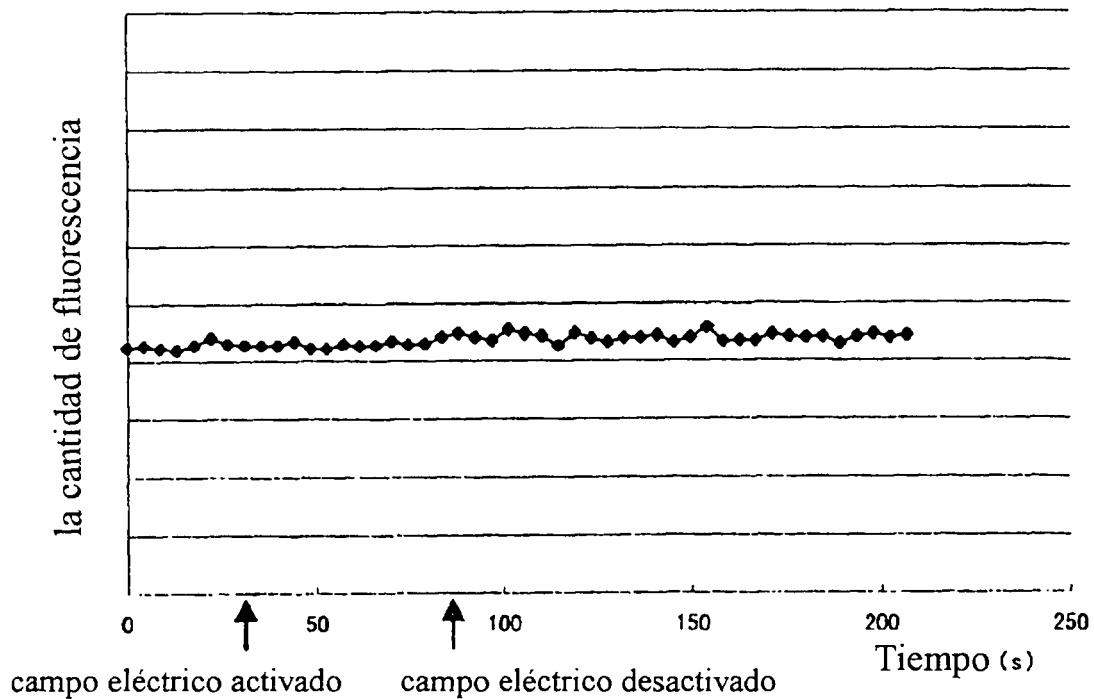


FIG. 15

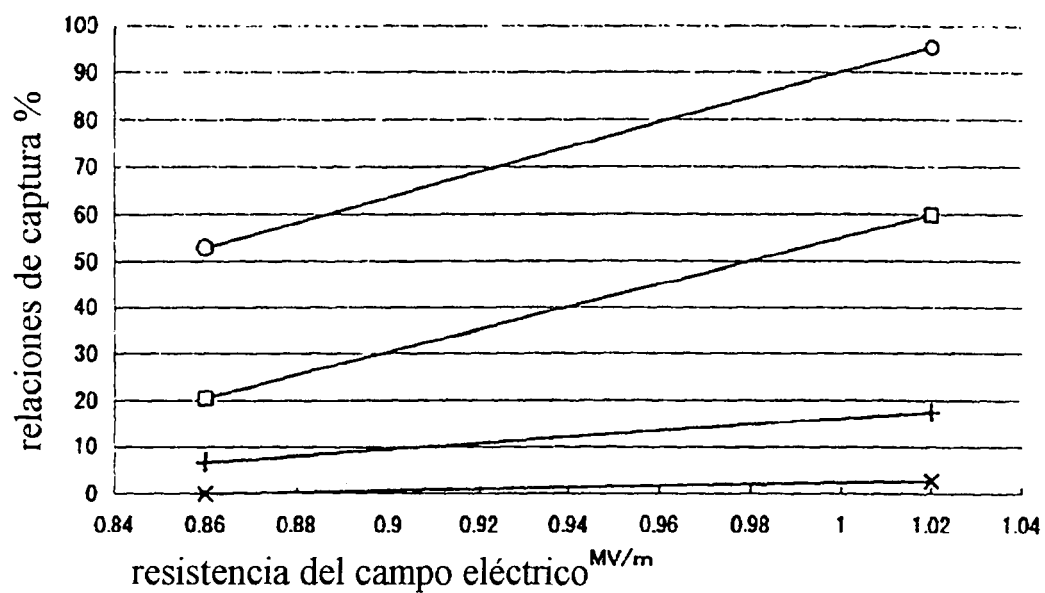


FIG. 16

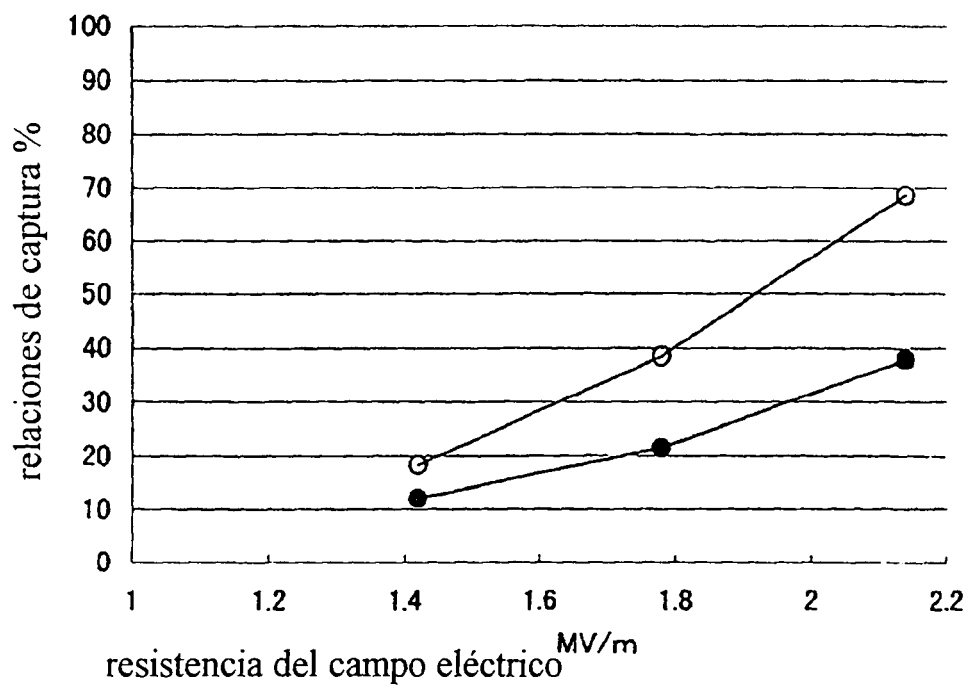


FIG. 17

