



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 359 320**

51 Int. Cl.:

**B01L 7/00** (2006.01)

**G05D 23/19** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05746850 .6**

96 Fecha de presentación : **03.06.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1771250**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **11.04.2007**

54

Título: **Control de temperatura de un recipiente de reacción, sistema con recipiente de reacción y uso del sistema.**

30

Prioridad: **04.06.2004 US 576820 P**  
**04.06.2004 FI 20040772**

73

Titular/es: **ABACUS DIAGNOSTICA Oy**  
**Tykistökatu 4 D**  
**20520 Turku, FI**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**20.05.2011**

72

Inventor/es: **Nurmi, Jussi;**  
**Korpimäki, Teemu;**  
**Lövgren, Timo;**  
**Kojola, Hannu y**  
**Iitiä, Antti**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**20.05.2011**

74

Agente: **Arias Sanz, Juan**

ES 2 359 320 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

Control de temperatura de un recipiente de reacción, sistema con recipiente de reacción y uso del sistema

**CAMPO DE LA INVENCION**

5 La presente invención se refiere a un procedimiento de control rápido de la temperatura de un recipiente de reacción que comprende un volumen de reacción para hacer reaccionar analitos biológicos o químicos con el fin de detectar y cuantificar dichos analitos en una muestra que contenga dichos analitos. La presente invención también se refiere a un sistema, y a un software para el sistema, que se usa en el procedimiento. La presente invención también se refiere al uso del sistema para la detección de tipos concretos de analitos.

**ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

10 La reacción en cadena de la polimerasa (PCR; Saiki y col., 1985) constituye un buen ejemplo de una reacción química que requiere un riguroso control de la temperatura: en la PCR, se amplifica una secuencia de ADN específica sometiendo la muestra de ADN a cambios cíclicos de temperatura. En primer lugar, se desnaturaliza el ADN molde de doble cadena aumentando la temperatura de la mezcla de reacción hasta aproximadamente 95 °C. Después, se baja la temperatura hasta aproximadamente entre 40 y 70 °C. A esta temperatura, se produce una hibridación de los cebadores sintéticos cortos de oligonucleótidos con sus secuencias complementarias, a las que se ha llevado a un estado de  
15 de cadena sencilla en la etapa previa de calentamiento. Tras esto, se puede aumentar la temperatura hasta aproximadamente 72 °C. A esta temperatura, una polimerasa de ADN termoestable extiende los cebadores, creando así una copia complementaria del ADN molde de cadena sencilla original. (En muchas aplicaciones, esta etapa de extensión se puede llevar a cabo a la misma temperatura que la etapa de hibridación. Con bastante frecuencia, tanto la hibridación del cebador como la extensión del cebador se llevan a cabo a aproximadamente 60 °C). Repitiendo el ciclo de temperatura muchas veces, si la eficiencia de amplificación es la ideal, la cantidad de ADN molde se dobla en cada ciclo. Además de la PCR, muchas, si no todas, las reacciones biológicas y químicas requieren una determinada temperatura para que se produzcan de forma predecible. Entre los ejemplos de dichas reacciones con condiciones de temperatura definidas, se incluyen otras reacciones de amplificación de ácidos nucleicos [como la amplificación basada en  
20 secuencias de ácidos nucleicos (NASBA) (Compton, 1991), reacción en cadena de la ligasa (LCR) (Barany, 1991), amplificación con desplazamiento de cadena (SDA) (Walker y col., 1992) y amplificación por círculo rodante (RCA) (Banér y col., 1998)], formación de inmunocomplejos (es decir unión de un anticuerpo a un antígeno) (Price y Newman, 1997) y prácticamente todas las demás reacciones enzimáticas y químicas.

30 Existen varias soluciones para controlar una temperatura de reacción. En la PCR, los recipientes de reacción se colocan normalmente en un bloque de metal, cuya temperatura se cambia periódicamente. Sin embargo, esta solución presenta un inconveniente importante: se requiere un tiempo considerable para que cambie la temperatura del bloque; una vez alcanzadas las temperaturas objetivo, la reacción se produce muy rápidamente. Por lo tanto, es la masa térmica del bloque, y no la reacción en sí, la que limita la velocidad de la reacción.

35 Se puede aumentar la tasa de cambio de la temperatura en el interior de un recipiente de reacción mediante una técnica conocida por los expertos en la materia como *over* o *under shooting* (exceso o defecto de temperatura): para enfriar el contenido de un recipiente de reacción hasta una baja temperatura objetivo, primero se enfría el bloque de metal hasta una temperatura inferior a la temperatura objetivo, tras lo cual, se vuelve a calentar el bloque de metal hasta la temperatura objetivo. O bien, para calentar el contenido del recipiente de reacción hasta una alta temperatura objetivo, primero se calienta el bloque de metal hasta una temperatura superior a la temperatura objetivo, tras lo cual, se enfría el  
40 bloque de metal hasta la alta temperatura objetivo. De este modo, se puede aumentar la tasa de cambio de la temperatura en el interior de un recipiente de reacción. No obstante, el procedimiento todavía es bastante lento, debido al hecho de que el bloque de metal tarda cierto tiempo en cambiar de temperatura.

Otra solución para el ciclado térmico incluye el uso de aire caliente y frío para cambiar la temperatura de una mezcla de reacción que se coloca en el interior de un capilar de vidrio con una gran relación superficie-volumen (Wittwer y col.,  
45 1997). Esto permite lograr un cambio de temperatura muy rápido. Sin embargo, cuando se usan capilares de vidrio, el volumen máximo de reacción a menudo es tan pequeño, que empieza a limitar la sensibilidad analítica de la aplicación. Además, las propiedades químicas del vidrio pueden inhibir algunas reacciones químicas. La fragilidad de los capilares de vidrio también supone un problema, ya que se rompen muy fácilmente al manipularlos. Otra solución se basa en mover físicamente la mezcla de reacción a través de un canal que pasa a través de áreas con diferentes temperaturas. Dicha técnica ha sido descrita, por ejemplo, por Kopp y col. (1998). No obstante, en estas aplicaciones, los volúmenes de reacción son aún más pequeños y, por tanto, la sensibilidad analítica se ve seriamente comprometida. Además, hay que reutilizar el mismo canal para muchas muestras, lo que introduce un serio riesgo de contaminación por arrastre entre  
50 diferentes muestras o, en caso contrario, los recipientes de amplificación tienen que ser de diseño desechable y de un solo uso, lo cual aumenta de forma considerable los costes totales del ensayo, ya que los costes de producción de los canales microfluídicos pueden ser mucho más elevados que los costes de producción de simples tubos de reacción de plástico; por supuesto, dependiendo del volumen de fabricación. Otra solución más se basa en tener varios bloques de metal o baños de agua a temperaturas definidas e ir cambiando la ubicación del recipiente de reacción cíclicamente entre los bloques o baños con diferentes temperaturas. Entre los ejemplos de termocicladores basados en este principio que se encuentran disponibles en el mercado, se incluyen el RoboCycler (Stratagene, EE.UU.) y el H2OBIT Thermal Cycler  
55 (ABgene, Reino Unido). En estas aplicaciones, se logra una mayor tasa de cambio de temperatura que con un único

bloque. Sin embargo, al emplear tubos de muestras con relaciones superficie-volumen pequeñas, la tasa de cambio de temperatura sigue sin ser tan rápida como puede llegar a serlo.

En los documentos US 4.902.624, EP 0 31 8255 y US 5.736.106, se han descrito técnicas en las que un recipiente de reacción con una elevada relación superficie-volumen se traslada cíclicamente entre bloques térmicos a temperaturas definidas. En estas soluciones se encuentran ciertos problemas. En primer lugar, la tasa de cambio de temperatura no es la ideal para todas las aplicaciones. En segundo lugar, cuando la mezcla de reacción se calienta a altas temperaturas, la presión en el interior del recipiente de reacción aumenta, lo cual puede hacer que se rompa el recipiente de reacción y que se evapore la mezcla de reacción.

En los casos en los que no se necesitan cambios cíclicos de temperatura, por ejemplo en la mayoría de los inmunoensayos, la práctica habitual consiste en colocar el recipiente de reacción en la atmósfera de un incubador ajustado a una temperatura definida. En estos procedimientos, se tarda un tiempo considerable en calentar o enfriar el contenido del recipiente de reacción, ya que, debido a la baja relación superficie-volumen de los recipientes y a la escasa conductividad térmica del aire estático, la tasa de intercambio térmico entre el recipiente y su entorno no es la ideal. En el documento US 5.446.263 se describe un dispositivo para ajustar selectivamente la temperatura de una muestra a diferentes valores.

### **OBJETIVOS Y RESUMEN DE LA PRESENTE INVENCION**

Un objeto de la presente invención consiste en proporcionar un procedimiento para un rápido control térmico de un volumen de reacción (4) de un recipiente de reacción (2). Otro objeto de la presente invención consiste en proporcionar un sistema mejorado (20) para detectar y/o cuantificar un analito o analitos biológicos y/o químicos en una muestra que supuestamente contenga dicho analito o analitos. Otro objeto más de la presente invención consiste en proporcionar usos para el sistema de detección y/o cuantificación.

De este modo, la invención se refiere a un procedimiento según la reivindicación 1.

La invención también se refiere a un sistema (20) para detectar y/o cuantificar un analito o analitos biológicos y/o químicos en una muestra que se supone que contiene dicho analito o analitos según la reivindicación 8.

La invención también se refiere a usos del sistema según la invención para la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR en tiempo real), para reacciones de amplificación de ácidos nucleicos, preferentemente la amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos (NASBA), amplificación con desplazamiento de cadena (SDA), amplificación por círculo rodante (RCA) y reacción en cadena de la ligasa (LCR), y para ensayos de unión de ligandos.

### **BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS**

La fig. 1 muestra un dibujo esquemático de una forma de realización de un recipiente de reacción según la presente invención.

Las figs. 2a y 2b muestran esquemáticamente una forma de realización de un sistema según la presente invención.

La fig. 3 muestra el control de la temperatura de un recipiente de reacción usando un procedimiento de ciclado térmico y un sistema para el control térmico según la presente invención y un termociclador convencional.

La fig. 4 muestra un gráfico de amplificación que muestra la aplicabilidad de la presente invención para llevar a cabo reacciones en cadena de polimerasa en tiempo real.

La fig.5 muestra esquemáticamente la manera en que se puede llevar a cabo el control de la temperatura de recipientes de reacción según la invención.

### **DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION**

La expresión *ensayo de unión de ligandos*, tal como se usa en la presente memoria descriptiva, se refiere a cualquier procedimiento analítico en el que se forme al menos un enlace covalente o no covalente entre un agente unión y un ligando del mismo.

La expresión *agente de unión*, tal como se usa en la presente memoria descriptiva, se refiere a cualquier molécula capaz de formar al menos un enlace covalente o no covalente con una segunda molécula. Los ejemplos de agentes de unión incluyen, entre otros, inmunoglobulinas y derivados de las mismas, tales como anticuerpos recombinantes, fragmentos Fab y fragmentos scFv; ligandos de unión de ácidos nucleicos tales como ácidos nucleicos y derivados de ácidos nucleicos y aptámeros y ADNzimas y ribozimas; y proteínas capaces de unirse a ligandos específicos.

El término *ligando*, tal como se usa en la presente memoria descriptiva, se refiere a cualquier molécula capaz de formar al menos un enlace covalente o no covalente con un agente de unión. Los ligandos pueden ser de origen natural o sintético. En un ensayo de unión de ligandos, un ligando puede ser el analito y/o una sustancia necesaria para la detección del analito.

La expresión *temperatura próxima a la temperatura objetivo*, tal como se usa en la presente memoria descriptiva, se

refiere a una temperatura que no sea más de 3 °C más alta o más baja que la temperatura objetivo, normalmente no más de 1 °C más alta o más baja que la temperatura objetivo, preferentemente no más de 0,5 °C más alta o más baja que la temperatura objetivo.

5 La presente invención proporciona un procedimiento que permite un rápido control térmico del contenido de un recipiente de reacción. Normalmente se llevan a cabo varios cambios de temperatura en el volumen de reacción, y más de uno de dichos cambios de temperatura se llevan a cabo usando un par de bloques térmicos consistentes en un primer y un segundo bloque térmico, en los que cada bloque térmico de cada uno de dichos pares puede ser también un bloque térmico de uno o más de los otros pares mencionados, de acuerdo con las etapas a) y b) definidas anteriormente. Preferentemente, todos los cambios de temperatura del volumen de reacción se llevan a cabo siguiendo estas etapas.

10 Mediante el uso de un primer y un segundo bloque de acuerdo con las anteriores etapas a) y b), la tasa de cambio de temperatura en el interior de un recipiente de reacción es más alta que en el caso en el que se usa únicamente un segundo bloque, mantenido a la temperatura objetivo, para cambiar la temperatura en el interior del recipiente de reacción hasta alcanzar la temperatura del segundo bloque. Otra ventaja más de usar un primer bloque de acuerdo con la anterior etapa a) consiste en que la temperatura del segundo bloque, mantenida a la temperatura objetivo, permanece más constante, lo cual da lugar a un control más preciso de la temperatura en el interior del recipiente de reacción. Esto se debe a que, cuando se usa un primer bloque de acuerdo con la anterior etapa a), un recipiente de reacción que pasa, de acuerdo con la anterior etapa b), al segundo bloque mantenido a la temperatura objetivo ya se encuentra a la temperatura objetivo o a una temperatura próxima a la temperatura objetivo. Debido a que la diferencia de temperatura entre el recipiente de reacción y el segundo bloque mantenido a la temperatura objetivo es muy pequeña en el momento de trasladar el recipiente de reacción al segundo bloque, el efecto del recipiente de reacción en la temperatura del segundo bloque es muy pequeño. Si no se usó un primer bloque de acuerdo con la anterior etapa a), el efecto del traslado de un recipiente de reacción a un bloque mantenido a la temperatura objetivo tendría un mayor impacto sobre la temperatura del bloque y, por consiguiente, haría falta tiempo y energía para volver a llevar la temperatura del bloque a la temperatura objetivo. Esto haría que fuera más difícil controlar la temperatura del contenido del recipiente de reacción.

25 El recipiente suele tener forma plana y comprende un espacio continente en el que se pueden producir reacciones específicas de analitos. Además, el recipiente comprende dos canales y dos orificios. Cuando se introduce una muestra en el recipiente a través de un primer orificio, dicha muestra fluye a través de un primer canal hacia dicho espacio continente y el exceso de gas fluye desde dicho espacio continente a través de un segundo canal y sale del recipiente de reacción a través de un segundo orificio. Normalmente, las paredes del recipiente son delgadas y una de las paredes está hecha, normalmente, de un material que es permeable a la luz visible y ultravioleta y una de las paredes está hecha de un material con una alta conductividad térmica, tal como una hoja metálica.

30 El procedimiento de la presente invención prevé un rápido control térmico de un líquido. El procedimiento comprende normalmente las etapas consistentes en: colocar dicho líquido en el interior de un recipiente de reacción normalmente plano; colocar dicho recipiente de reacción en un soporte de recipientes de reacción que esté fijado a un soporte móvil que puede adoptar diferentes posiciones; y mover dicho soporte móvil con el fin de colocar el recipiente de reacción en una hendidura que se encuentra en el interior de un bloque térmico mantenido a una temperatura definida. Para aumentar la temperatura en el interior del recipiente de reacción hasta una determinada temperatura objetivo, el recipiente se coloca, en primer lugar, en la hendidura de un bloque térmico que está más caliente que dicha temperatura objetivo y, después, se coloca en un bloque que se encuentra a dicha temperatura objetivo. Para reducir la temperatura en el interior del recipiente de reacción hasta una segunda temperatura objetivo, el recipiente se coloca, en primer lugar, dentro de un bloque térmico que está más frío que dicha segunda temperatura objetivo y, después, en un bloque que se encuentra a dicha segunda temperatura objetivo.

40 La presente invención también proporciona un sistema para detectar y/o cuantificar un analito o analitos biológicos y/o químicos en una muestra que supuestamente contiene dicho analito o analitos, que comprende un sistema de ciclado de temperatura para un rápido control térmico de un líquido, según la reivindicación 8.

45 En una típica forma de realización de la invención, la conductividad térmica del segundo material, es decir, el material de la segunda pared del volumen de reacción del recipiente de reacción, es  $\geq 10$  mW/mmK, preferentemente  $\geq 100$  mW/mmK. Normalmente, el material es un metal, preferentemente aluminio o cobre. El grosor de la segunda pared es normalmente  $\leq 0,5$  mm, preferentemente  $\leq 0,1$  mm. La superficie exterior de la segunda pared es normalmente aplanada y, preferentemente, plana. En una forma de realización típica del recipiente de reacción según la invención, la relación del área de la segunda pared que encierra, es decir, el área de la segunda pared orientado hacia, el volumen de reacción con respecto a dicho volumen es  $\geq 0,5$  mm<sup>2</sup>/μl, preferentemente  $\geq 5$  mm<sup>2</sup>/μl.

50 Normalmente, la primera pared del recipiente de reacción es permeable a la luz visible y a la ultravioleta (UV). El primer material de la primera pared es normalmente plástico o vidrio. El grosor de la primera pared es, normalmente,  $\leq 5$  mm, preferentemente  $\leq 2$  mm.

55 En el sistema según la invención, el recipiente de reacción comprende una entrada para introducir la muestra y, opcionalmente, reactivos en el volumen de reacción y una salida del recipiente de reacción para evacuar el aire desplazado y/o la muestra y los reactivos del volumen de reacción. El recipiente de reacción también comprende un volumen de expansión, para la expansión de la muestra y/o los reactivos durante la reacción y/o para dar contener la presión de vapor creada por el calentamiento.

60

En formas de realización preferidas del procedimiento de la invención, la relación del área de la segunda pared en contacto directo con los bloques térmicos con respecto al volumen de reacción es  $\geq 0,5 \text{ mm}^2/\mu\text{l}$ , preferentemente  $\geq 5 \text{ mm}^2/\mu\text{l}$ .

- 5 Las típicas formas de realización del sistema según la invención comprenden más de cuatro bloques térmicos a diferentes temperaturas predeterminadas. En algunas formas de realización preferidas, las temperaturas predeterminadas de estos cuatro bloques serían de aproximadamente: 10 a 25 °C; 40 a 72 °C; 80 a 98 °C; y 90 a 120 °C. No obstante, el número de bloques puede ser mayor de cuatro y las temperaturas de los bloques pueden ser distintas a las temperaturas que se indican. Las típicas formas de realización del sistema comprenden unos medios para poner más de una de las paredes de dichos recipientes de reacción en contacto directo con los bloques térmicos. Los medios para poner la pared o paredes del recipiente de reacción en contacto directo con los bloques térmicos comprenden normalmente un soporte para dicho recipiente con unos medios para mover dicho soporte en una trayectoria circular o lineal y dichos bloques térmicos se encuentran en diferentes puntos de dicha trayectoria circular o lineal, de manera que dicha pared o paredes de dicho recipiente de reacción se puedan poner en contacto directo con cada bloque térmico moviendo dicho soporte a lo largo de dicha trayectoria circular o lineal.
- 10
- 15 El sistema comprende unos medios para presionar la pared o paredes de dicho recipiente de reacción contra la pared o paredes de los bloques térmicos, en contacto directo unas con otras. Tales medios podrían ser cualquier medio mecánico, electromecánico, neumático o hidráulico, por ejemplo, unos medios sencillos que comprendan uno o más muelles.

#### Descripción del recipiente de reacción del sistema

- 20 La fig. 1 muestra un dibujo esquemático de un recipiente de reacción 2 de una forma de realización del sistema según la presente invención. Para mayor claridad, una pared 8 del recipiente 2 está separada del cuerpo 5 del recipiente. Durante su uso, la pared 8 está firmemente unida al cuerpo 5. El cuerpo 5 del recipiente 2 está hecho de polipropileno y la pared separada 8 de, por ejemplo, papel de aluminio. El cuerpo 5 es permeable a al menos una longitud de onda de la luz. El recipiente 2 comprende un orificio 10 para introducir una muestra, un canal a través del cual fluye la muestra hacia un volumen de reacción 4, un segundo canal, un volumen de expansión 25, un tercer canal y un segundo orificio 12 a través del cual el aire desplazado por la muestra sale del recipiente de reacción 2. El recipiente de reacción 2 puede sellarse, por ejemplo, presionando los orificios 10, 12 con una prensa caliente, de manera que el plástico se funda y, por lo tanto, bloquee los orificios 10, 12 o, por ejemplo, introduciendo unos tapones en los orificios 10, 12 que encajen de forma ajustada en los orificios 10, 12 y eviten que se produzcan escapes de líquido o gas a través de los orificios 10, 12 tras el sellado. Las formas de los orificios 10, 12; canales; volumen de reacción 4; y volumen de expansión 25 están determinadas por la estructura del cuerpo 5 del recipiente de reacción 2; no obstante, una pared 8 del recipiente de reacción 2 está hecha de un material relativamente delgado con una alta conductividad térmica, tal como un papel de aluminio que se pueda fijar al cuerpo 5 del recipiente 2, por ejemplo, con la ayuda de una prensa caliente. Otros materiales adecuados de la parte separada 8, distintos al papel de aluminio, pueden incluir, entre otros, cobre y otros metales. En esta forma de realización, la hoja metálica forma una pared de cada canal y del volumen de reacción 4 y del volumen de expansión 25. Las reacciones analíticas tienen lugar principalmente en el interior del volumen de reacción 4. Cuando se calienta una mezcla de reacción en el interior del volumen de reacción 4, el volumen de expansión 25 permite la expansión de la mezcla de reacción analítica en el interior del volumen de reacción 4 y evita que se rompa el recipiente de reacción 2, lo cual podría suceder debido al aumento de presión provocado por la evaporación producida durante el calentamiento. La alta relación superficie-volumen permite un rápido control térmico del contenido del recipiente de reacción. Por ejemplo, una relación superficie-volumen es 1 milímetro cuadrado por 1 microlitro y, preferentemente, debería ser incluso mayor. Para aumentar la velocidad del control térmico del contenido del recipiente de reacción, el recipiente de reacción es preferentemente aplanado: su grosor 11 es más pequeño que su anchura 13. La forma aplanada, junto con el hecho de que una de las paredes 8 esté fabricada con un material con una alta conductividad térmica, como por ejemplo papel de aluminio, permite conseguir un control térmico mejorado del contenido del volumen de reacción. Además de las características térmicas y estructurales del recipiente de reacción 2 de la presente invención, dicho recipiente 2 se caracteriza por sus propiedades ópticas. El cuerpo 5 del recipiente 2 está hecho, adecuadamente, de un material que permite realizar medidas de fluorescencia a través de la pared 6 del volumen de reacción 4 que comprende una parte del cuerpo 5 del recipiente 2. En una aplicación preferente, las medidas se realizan mediante fluorimetría en tiempo retardado. Todos los materiales usados para construir el recipiente 2 deben soportar preferentemente temperaturas elevadas (de hasta aproximadamente 80 a 120 °C), como las altas temperaturas necesarias para llevar a cabo la reacción en cadena de la polimerasa. Los materiales adecuados para el cuerpo 5 del recipiente 2 incluyen, entre otros, polipropileno y otros plásticos, así como vidrio. Se pueden construir algunas variaciones de la estructura básica del recipiente 2. Por ejemplo, se pueden montar varias composiciones de orificios, canales y volúmenes en un único cuerpo, lo que permite el análisis de más de una muestra en un cuerpo. Por otra parte, se pueden montar varios volúmenes de reacción, cada uno de ellos usado para el análisis de al menos un analito, en un único cuerpo, de manera que, cuando se introduzca la muestra a través del primer orificio, se divida en varios canales que lleven a distintos volúmenes de reacción. Se puede usar un recipiente de reacción del sistema según la presente invención, por ejemplo, para llevar a cabo una reacción en cadena de polimerasa (PCR), adecuadamente PCR en tiempo real, y otras reacciones de amplificación de ácidos nucleicos, tales como la amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos (NASBA), amplificación por desplazamiento de cadena (SDA), amplificación en círculo rodante (RCA), PCR de transcripción inversa (RT-PCR), y reacción en cadena de la ligasa (LCR). El recipiente de reacción también se
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60

puede usar para llevar a cabo inmunoensayos y otros ensayos de unión de ligandos.

### Descripción del sistema

Las figuras 2a y 2b muestran esquemáticamente una forma de realización de un sistema 20 según la presente invención. En la figura 2a, se ve el sistema 20 desde arriba y en la figura 2b se ve una sección transversal desde el lateral. El sistema 20 comprende recipientes de reacción 2, un disco 22 al que se fija un soporte del recipiente de reacción 24 y unos bloques de calentamiento 14 a 19. El disco 22 está controlado por un motor paso a paso (que no se muestra), que mueve el soporte del recipiente de reacción 24 y los recipientes 2 fijados al mismo desde un bloque de calentamiento 14 a 19 a otro 14 a 19, lo más rápido posible. El motor se controla mediante componentes electrónicos programables.

Uno 14 de los bloques de calentamiento 14 a 19 se podría denominar más precisamente bloque frío, considerando que está hecho para mantenerlo a una baja temperatura. Está hecho de un metal con unas propiedades de gran conductancia térmica. El bloque posee una rendija, que puede alojar los recipientes de reacción. La tapa de la rendija puede estar accionada por un resorte, de manera que presione ligeramente sobre las cubetas. El sistema comprende unos medios para presionar los recipientes de reacción contra la tapa o el fondo de la rendija, con el fin de lograr una mayor eficiencia en la transferencia de calor entre el bloque y el recipiente de reacción. El bloque frío se puede mantener a una temperatura de por ejemplo, 10 °C, lo cual se puede lograr con, por ejemplo, un elemento Peltier y los dispositivos electrónicos necesarios para controlarlo.

Algunos de los otros bloques de calentamiento 15 a 18 están hechos, asimismo, de un metal con propiedades de gran conductancia térmica. Los bloques 15 a 18 poseen rendijas, que pueden alojar los recipientes de reacción 2. Las tapas de las rendijas pueden estar accionadas por un resorte, de manera que estén presionadas ligeramente sobre los recipientes 2. El sistema comprende unos medios para presionar los recipientes de reacción contra la tapa o el fondo de la rendija, con el fin de lograr una mayor eficiencia en la transferencia de calor entre el bloque y el recipiente de reacción. Las temperaturas de los bloques de calentamiento 15 a 18 se pueden ajustar (normalmente entre 40 y 120 °C) con calentadores y dispositivos electrónicos que los controlen (que no se muestran).

Otro 19 de los bloques de calentamiento 14 a 19 es un bloque de medición 19. Este bloque 19 es como los bloques de calentamiento, pero con un orificio en su parte superior para realizar mediciones de fluorescencia. Es necesario proteger de la luz externa el bloque y los recipientes de reacción situados en el mismo.

El bloque de medición del dispositivo posee una fuente de luz UV (por ejemplo, una lámpara de destellos), cuya energía es guiada hacia el recipiente que se va a medir a través de filtros, lentes y el orificio del bloque de medición. La emisión con tiempo de vida largo (aproximadamente 100  $\mu$ s) procedente del recipiente después de que haya terminado la excitación es guiada a través del orificio en el bloque de medición, lentes y filtros y, por último, se mide con, por ejemplo, un tubo fotomultiplicador.

El propósito del sistema 20 consiste en cambiar la temperatura de líquidos situados en el interior de recipientes de reacción 2 lo más rápido posible entre temperaturas normalmente dentro del intervalo de 40 a 120 °C. Normalmente, el sistema 20 debería ser capaz de medir la fluorescencia en tiempo retardado de los recipientes de reacción 2. El usuario puede programar las temperaturas de los bloques (normalmente, el bloque frío está siempre a 10 °C, los bloques de calentamiento a temperaturas de 40 a 120 °C), la programación temporal seguida por el motor paso a paso y la programación temporal de la medición de fluorescencia se puede controlar con un ordenador portátil que actúe como interfaz con el sistema, o bien con un panel de interfaz integrado. El sistema es, preferentemente, lo más pequeño y ligero posible. Puede ser portátil o incluso de mano.

El software que se usa para controlar el proceso de control térmico dirige los traslados precisos del recipiente de reacción entre diferentes bloques térmicos con el fin de lograr un perfil térmico deseado para la mezcla de reacción en el interior del recipiente. En principio, el control de temperatura en el interior del recipiente puede estar basado en dos mecanismos diferentes: los tiempos de incubación en los diferentes bloques térmicos se pueden calibrar con un sensor de temperatura, de manera que se consiga un perfil térmico que se aproxime lo máximo posible al perfil térmico deseado programando los tiempos aproximados que debe permanecer el recipiente en cada bloque térmico. Otra posibilidad consiste en construir un mecanismo de realimentación que permita al programa medir la temperatura en el interior del recipiente en tiempo real y llevar a cabo los traslados necesarios basándose en la temperatura real que existe en el interior del recipiente. El software incluido en el sistema puede utilizar ambos o solo uno de estos mecanismos para controlar el procedimiento de control térmico.

Además de controlar los cambios de temperatura, la unidad de procesamiento de datos y el software correspondiente se usan o pueden usarse en la detección y/o cuantificación del analito o analitos. Si el sistema incorpora una unidad de medida de fluorescencia o de fluorescencia en tiempo retardado, el software se puede usar para dirigir la unidad de medición, de manera que se registren las señales de fluorescencia o fluorescencia en tiempo retardado del interior del recipiente durante el protocolo de ciclado térmico o bien después de que finalice el protocolo de ciclado térmico. A continuación, el software, siguiendo un algoritmo analítico contenido en el software o programado por el usuario o por el fabricante del sistema, calcula y presenta un resultado cualitativo y/o cuantitativo de la reacción particular basado en el resultado o resultados de la medición o mediciones de fluorescencia o fluorescencia en tiempo retardado. Si, por ejemplo, el recipiente de reacción se usa en la detección de una bacteria nociva mediante PCR, el recipiente de reacción puede contener una muestra de la que se sospeche que contiene la bacteria, y todos los reactivos de la PCR, incluidos

los reactivos de detección fluorogénica que emiten una señal de fluorescencia aumentada si se amplifica el ADN de dicha bacteria nociva en el interior del recipiente. En dicho caso, el software estaría programado para controlar la unidad de medición de fluorescencia de manera que la unidad de medición realice mediciones de fluorescencia a intervalos apropiados, y para que el recipiente de reacción esté colocado adecuadamente con respecto a la unidad de medición. En función de las señales de fluorescencia registradas, el software informa de si la muestra contenía o no dicha bacteria. Además de dichos procedimientos analíticos cualitativos, el software puede realizar cálculos que permitan determinar de forma cuantitativa el analito buscado.

Normalmente, el software también contiene funciones que permite el control de calidad de los resultados con la ayuda de muestras de control definidas que contienen una cantidad conocida del analito buscado. El software también permite almacenar los datos térmicos y analíticos de los ciclos térmicos realizados y las operaciones de medición. También se puede incluir en el sistema un lector de códigos de barras que esté conectado con el software de manera que el software reconozca cada recipiente de reacción introducido en el sistema, basándose en un código de barras impreso en el recipiente y, en función de la información almacenada en el software, pueda llevar a cabo un protocolo deseado de ciclo térmico y mediciones, y de analizar, comunicar y almacenar los datos obtenidos, de una manera que resulte apropiada para el recipiente de reacción en cuestión. Los expertos en la materia observarán que, en lugar de un código de barras, se puede usar una técnica de codificación diferente, siempre que sea capaz de comunicar información relevante acerca del contenido del recipiente de reacción al software que controla el sistema.

### Control de temperatura

Para controlar la temperatura en el interior de un recipiente de reacción como el descrito anteriormente, un procedimiento ideal consiste en fijar el recipiente de reacción a un soporte firme que sea capaz de adoptar varias posiciones diferentes. Junto al soporte firme, se colocan varios bloques térmicos. Lo ideal sería que los bloques estuvieran hechos de un metal u otro material con una alta conductividad térmica. Los bloques tienen, adecuadamente, una forma que incorpora una hendidura en la que el recipiente de reacción encaja de la forma más apretada posible. En una forma de realización ideal de la presente invención, los bloques también presentan un mecanismo, por ejemplo, una tapa de resorte, que garantiza un contacto estrecho entre el bloque y el recipiente de reacción cuando el soporte firme se mueve para introducir un recipiente de reacción en una hendidura de un bloque térmico. En una forma de realización adecuada, el tamaño del bloque térmico y de la hendidura incluida en el mismo es tal que cuando se coloca un recipiente de reacción en el interior de la hendidura del bloque térmico, al menos una, preferentemente dos y preferentemente tres superficies del recipiente de reacción queden cubiertas por la superficie del bloque térmico en la mayor medida posible. Al menos uno de los bloques térmicos puede incluir también un orificio que esté situado de tal manera que, cuando haya un recipiente de reacción situado en la hendidura del bloque térmico que incorpore dicho orificio, puedan realizarse mediciones de luminiscencia a través del orificio y la pared de un volumen de reacción. Para aumentar la temperatura en el interior del recipiente de reacción hasta llegar a una temperatura objetivo, el soporte firme al que está fijado el recipiente se mueve para introducir el recipiente de reacción en la hendidura de un bloque térmico que está más caliente que la temperatura objetivo. El recipiente de reacción se mantiene en este primer bloque de calentamiento durante un tiempo necesario para que la temperatura en el interior del recipiente alcance la temperatura objetivo o se aproxime a ella; a continuación, el soporte firme se mueve para trasladar el recipiente de reacción del primer bloque de calentamiento a un segundo bloque que se mantiene a la temperatura objetivo. Para enfriar el contenido de un recipiente de reacción, el recipiente se traslada en primer lugar a la hendidura de un bloque que está más frío que la temperatura objetivo; se mantiene en el bloque de enfriamiento durante un tiempo necesario para disminuir la temperatura en el interior del recipiente de reacción hasta que alcance la temperatura objetivo fría o se aproxime a ella; y, después, el recipiente se traslada a un bloque que se mantiene a la temperatura objetivo fría. De este modo, la tasa de cambio de temperatura en el interior del recipiente de reacción se puede acelerar, si se compara con un procedimiento en el que el recipiente de reacción se traslada directamente a una temperatura objetivo o si se compara con un procedimiento en el que se cambia la temperatura del bloque térmico, en lugar de la posición del recipiente de reacción. El soporte firme y los bloques térmicos situados alrededor se pueden construir de muchas maneras diferentes. Adecuadamente, por ejemplo, los bloques térmicos están colocados en círculo, de manera que el soporte firme, colocado en el medio o justo en el exterior del círculo formado por los bloques, pueda cambiar la posición del recipiente de reacción fijado al mismo, realizando un movimiento circular alrededor de su propio eje (en cuyo caso, el soporte firme se encuentra en el medio del círculo formado por los bloques) o bien alrededor del eje del círculo formado por los bloques (en cuyo caso, el soporte firme está situado fuera del círculo formado por los bloques). Otra posibilidad consiste en colocar los bloques térmicos, por ejemplo, en fila, en cuyo caso, el soporte firme se mueve hacia delante y hacia atrás a lo largo de la fila para trasladar un recipiente de reacción de un bloque térmico a otro. Además, en una configuración con un único instrumento, pueden existir varios conjuntos de bloques térmicos para permitir el control simultáneo de varios recipientes de reacción. Además, los bloques térmicos pueden tener un tamaño mayor que el de un único recipiente de reacción, lo cual permite introducir más de un recipiente de reacción al mismo tiempo.

### Ejemplos

#### Ejemplo 1

*Efecto del uso de bloques térmicos más calientes y más fríos que las temperaturas objetivo sobre la tasa de aumento y disminución de temperatura en el recipiente de reacción del sistema.*

Para optimizar la velocidad del ciclado térmico, se construyó un sistema de acuerdo con la presente invención que comprende varios bloques de calentamiento mantenidos a temperaturas predeterminadas. Los bloques se mantuvieron a 29 °C (el bloque frío); 61 °C; 97 °C y 115 °C. Se colocó un sensor de temperatura en el interior de un recipiente de reacción plano y se determinaron las tasas de calentamiento y enfriamiento del contenido del recipiente usando dos procedimientos diferentes de ciclado térmico. En el primer procedimiento, el recipiente de reacción se trasladó desde el bloque a 61 °C directamente al bloque a 97 °C y desde el bloque a 97 °C directamente de nuevo al bloque a 61 °C. El segundo procedimiento se llevó a cabo de acuerdo con la presente invención, de manera que, para calentar el contenido del recipiente de reacción desde 61 °C a 97 °C, se trasladó el recipiente desde el bloque a 61 °C hasta el bloque mantenido a 115 °C durante diez segundos, tras lo cual, el recipiente se trasladó al bloque a 97 °C. Desde el bloque a 97 °C, el recipiente se trasladó al bloque a 29 °C durante diez segundos, tras lo cual, el recipiente se volvió a trasladar al bloque a 61 °C. Los tiempos empleados para calentar el contenido del recipiente de 61 a 97 °C (tiempo de calentamiento) y enfriarlo de 97 a 61 °C (tiempo de enfriamiento) se registraron usando estos dos procedimientos diferentes de ciclado térmico. Usando el primer procedimiento, el tiempo de calentamiento de 61 a 97 °C fue de 25 segundos y el tiempo de enfriamiento de 97 a 61 °C fue de 48 segundos. Con el segundo procedimiento, el procedimiento de la presente invención, el tiempo de calentamiento fue de solo 8 segundos, es decir, menos que el tiempo durante el que se incubó el recipiente a 115 °C. El tiempo de enfriamiento usando el segundo procedimiento fue de solo 7 segundos. Claramente, el procedimiento de la presente invención proporciona una mejora considerable en la velocidad del ciclado térmico: durante una reacción PCR de 40 ciclos, estos ahorros de 58 segundos por ciclo suman aproximadamente 40 minutos de tiempo ahorrado, lo cual es importante para un laboratorio que tiene que llevar a cabo el mayor número posible de reacciones PCR durante un día de trabajo. Cabe señalar que los tiempos de incubación y temperaturas exactas usados en este ejemplo se escogieron arbitrariamente; se puede lograr una velocidad aún mayor ajustando el bloque frío a una temperatura más fría y el bloque caliente a una temperatura más caliente. En este experimento, se usaron incubaciones de 10 segundos en los bloques caliente y frío, pero en realidad resultaron ser demasiado prolongadas: las temperaturas objetivo se alcanzaron en menos de 10 segundos. Lo ideal sería haber trasladado el recipiente de reacción desde el bloque caliente al bloque a 97 °C tras 8 segundos y desde el bloque frío al bloque a 61 °C tras 7 segundos para impedir que el recipiente de reacción alcanzara temperaturas superiores a 97 °C o inferiores a 61 °C.

### Ejemplo 2

*Efecto del uso de papel de aluminio como material para el recipiente de reacción del sistema sobre la tasa de cambio de temperatura en el interior del recipiente.*

Para determinar el efecto del uso de un papel de aluminio en lugar de una pared de plástico en un lado del recipiente de reacción, se revistieron dos mitades idénticas del recipiente con papel de aluminio o bien con una lámina de plástico. Se colocó un sensor de temperatura en el interior de cada recipiente y se determinaron las tasas de cambio de temperatura para ambos recipientes usando un sistema de acuerdo con la presente invención. Esto se hizo cambiando la posición del recipiente desde un bloque térmico ajustado a 105 °C hasta un bloque ajustado a 27 °C para enfriar o, a la inversa, para calentar. Se registraron datos de medición de temperatura diferentes para el enfriamiento y el calentamiento del contenido de los recipientes. Los datos se ajustaron a una única función exponencial y se determinaron las vidas medias de cambio de temperatura, es decir, los tiempos necesarios para que la temperatura del interior del recipiente cambie hasta el punto intermedio entre 105 °C y 27 °C. Cuando se usó una lámina de plástico, las vidas medias para el enfriamiento y el calentamiento fueron, respectivamente, de 7,6 y 9,6 segundos; para un recipiente que incorpora una pared hecha de un papel de aluminio, las vidas medias fueron de 5,7 y 6,3 segundos. Por lo tanto, queda claro que el uso de una pared hecha de un material con una alta conductividad térmica ofrece una clara ventaja en lo referente a la velocidad de control térmico.

### Ejemplo 3

*Velocidad de ciclado térmico usando el procedimiento y sistema de la presente invención frente a un procedimiento convencional de ciclado térmico.*

Para demostrar el efecto acelerador de la presente invención sobre la velocidad del ciclado térmico, se colocaron sensores de temperatura en el interior de un recipiente de reacción de acuerdo con la presente invención y en el interior de un tubo de plástico para PCR de 0,2 ml. Ambos recipientes de reacción se llenaron con agua y se midieron las temperaturas en el interior de los recipientes durante un protocolo normal de ciclado térmico, durante el cual la temperatura varió cíclicamente entre 95 °C y 60 °C. Se controló la temperatura del interior del recipiente de reacción de acuerdo con la presente invención, usando un sistema de acuerdo con la presente invención, en el que el recipiente de reacción se colocó en un soporte firme, que tenía forma cilíndrica. Alrededor del soporte firme, se colocaron cuatro bloques térmicos, cuyas temperaturas se mantuvieron a 27 °C, 60 °C, 95 °C y 105 °C. Para aumentar la temperatura en el interior del recipiente hasta 95 °C, el recipiente se colocó, en primer lugar, en el interior de la hendidura del bloque mantenido a 105 °C; después, tras unos segundos, el recipiente se trasladó al bloque a 95 °C. A continuación, para enfriar el volumen de reacción hasta 60 °C, el recipiente se trasladó, en primer lugar, a la hendidura del bloque a 27 °C durante unos segundos, tras lo cual se trasladó al bloque a 60 °C. Para establecer la comparación, las tasas de cambio de temperatura se midieron dentro de un tubo convencional para PCR de 0,2 ml, del cual se controló la temperatura del contenido usando un aparato PTC 200 DNA Engine (MJ Research, EE.UU.).

La figura 3 muestra el control de la temperatura de un recipiente de reacción usando un procedimiento de ciclado térmico

- 5 y un sistema para el control térmico de acuerdo con la presente invención (cuadrados abiertos; "Proto") o usando un tubo convencional para PCR de 0,2 ml y paredes delgadas y un ciclado térmico convencional (PTC 200 DNA Engine, MJ Research, EE.UU.; triángulos abiertos, PCR MJ-Res). Los datos de medición de temperaturas se muestran en función del tiempo transcurrido. La tasa de cambio de temperatura usando el sistema de acuerdo con la presente invención (cuadrados) es mucho más alta que la tasa obtenida usando una máquina de PCR convencional (triángulos), que se basa en el uso de un bloque de metal, cuya temperatura se cambia periódicamente. El tiempo necesario para cambiar la temperatura en el interior del recipiente de reacción entre las dos temperaturas objetivo (95 y 60 °C) es mucho más corto para el prototipo de instrumento que para la máquina de PCR convencional.
- 10 La figura 5 muestra esquemáticamente el modo en que se puede llevar a cabo el control de temperatura de los recipientes de reacción. La figura muestra la temperatura de los recipientes de reacción durante las etapas "a" a "h" en función del tiempo. Las etapas son las siguientes:
- a) 0 s: los recipientes se mueven a un bloque de calentamiento a 120 °C
  - b) 2 s: los recipientes se mueven a un bloque de calentamiento a 95 °C
  - c) 12 s: los recipientes se mueven a un bloque frío a 10 °C
  - 15 d) 15 s: los recipientes se mueven a un bloque de calentamiento a 60 °C
  - e) 40 s: los recipientes se mueven a un bloque frío a 10 °C
  - f) 41 s: los recipientes se mueven a un bloque de medición a 50 °C
  - g) 42 a 45 s: se realizan las mediciones de fluorescencia
  - h) 46 s: los recipientes se mueven a un bloque de calentamiento a 120 °C; comienza un nuevo ciclo.
- 20 La curva de temperaturas que muestra la temperatura de los recipientes durante las etapas anteriores demuestra claramente un rapidísimo control de temperatura de los recipientes.

### Ejemplo 3

*Uso del procedimiento y sistema de acuerdo con la presente invención para llevar a cabo la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real*

- 25 Para demostrar la aplicabilidad de la presente invención para llevar a cabo la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, se preparó un ensayo de PCR para el bacteriófago T4. La química del ensayo fue descrita por Nurmi y col. (2002). Las secuencias de los oligonucleótidos usadas en el ensayo fueron las siguientes: cebador 5' ATGTTCCACGCTAAAAGACCTTATTGAAAA (N.º ID de SEC: 1); cebador 3' CAGCAGAATGAACCGAATCCACAAATAT (N.º ID de SEC: 2); sonda marcada con europio ATTATTCATCACCGAGCGACTATTCAAGATA (N.º ID de SEC: 3) y sonda con neutralizador ("quencher") marcada con QSY-7 GCTCGGTGATGAATAAT (N.º ID de SEC: 4). Las reacciones de amplificación de 30 µl consistieron en: tampón Taq 1 X HotMaster (Eppendorf, Alemania), 0,3 µM de cebadores, 28 nM de sonda de europio, 280 nM de sonda con neutralizador, 2,5 mM de cloruro de magnesio, 0,2 mM de dNTPs y 1,25 U de polimerasa Taq HotMaster. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo usando el tipo de recipiente de reacción descrito en la fig. 1. Para el ciclado térmico, se usó un termociclador de acuerdo con la presente invención (ejemplo 2). Se usó un protocolo de ciclado térmico consistente en 40 ciclos de 3 segundos a 95 °C y 13 segundos a 60°C con un calentamiento y enfriamiento en los bloques mantenidos a 110 y 25 °C, respectivamente. Se midió la fluorescencia del europio en tiempo retardado en determinados ciclos de la PCR seleccionados. Todas las mediciones se realizaron a temperatura ambiente.
- 30 La figura 4 muestra una gráfica de amplificación que muestra la aplicabilidad de la presente invención para llevar a cabo reacciones en cadena de polimerasa en tiempo real. Se muestran gráficas de amplificación obtenidas a partir de una reacción de control negativa (NTC), en la que no se añadió ADN del bacteriófago T4 a la reacción y de una reacción positiva, en la que se añadieron aproximadamente 100 copias de DNA T4 como molde. Como puede observarse en la figura, la presencia del ADN buscado específico en la muestra da lugar a un aumento detectable en la fluorescencia del europio. Por lo tanto, queda claro que el recipiente de reacción, el procedimiento de control térmico y sistema de ciclado térmico descritos en la presente memoria descriptiva se puede aplicar a la PCR en tiempo real.
- 40
- 45

Se observará que los procedimientos de la presente invención se pueden incorporar en diversas formas de realización, de las que solo se describen algunas en la presente memoria descriptiva.

REFERENCIAS

- Baner J, Nilsson M, Mendel-Hartvig M, Landgren U. (1998) Signal amplification of padlock by rolling circle replication. *Nucleic Acids Res.* 26(22):5073-8.
- Barany F. (1991) Genetic disease detection and DNA amplification using cloned thermostable ligase. *Proc. Natl Acad Sci EE.UU.* 88(1):189-93.
- 5 Compton J. (1991) Nucleic acid sequence-based amplification . *Nature.* 350(6313):91-2.
- Kopp MU, Mello AJ, Manz A. (1998) Chemical amplification: continuous-flow PCR on a chip. *Science.* 280(5366):1046-8.
- Nurmi J, Wikman T, Karp M, Lovgren T. (2002) High performance real-time quantitative RT-PCR using lanthanide probes and a dual-temperature hybridization assay. *Anal cChem.* 74(14):3525-32.
- Price CP, Newman DJ (ed.) (1997) Principles and practice of immunoassay. Macmillan, Londres.
- 10 Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mulli KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230:1350-4.
- Walker GT, Fraiser MS, Schram JL, Little MC, Nadeau JG, Malinowski DP. (1992) Strand displacement amplification-an isothermal, in vitro DNA amplification technique. *Nucleic Acids Res.* 20(7):1691-6.
- 15 Wittwer CT, Ririe KM, Andrew RV, David DA, Gundry RA, Balis UJ. (1997) The LightCycler: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. *Biotechniques.* 22(1):176-81.

## REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para el rápido control térmico de un volumen de reacción (4) de un recipiente de reacción (2) que comprende un volumen de reacción (4) cerrado  $\leq 2$  ml, preferentemente  $\leq 50$   $\mu$ l, rodeado por al menos dos paredes (6, 8), una primera pared (6) y una segunda pared (8), siendo dicha primera pared (6) de un primer material que es permeable a al menos una longitud de onda de la luz y siendo dicha segunda pared (8) de un segundo material con una alta conductividad térmica en el que el control térmico de dicho volumen de reacción (4) en dicho recipiente de reacción (2) comprende un cambio de temperatura del volumen de reacción (4) desde una temperatura anterior hasta una temperatura objetivo en el que dicho cambio de temperatura se lleva a cabo:
- 5 a) poniendo las paredes (6, 8) del recipiente de reacción (2) en contacto con un primer bloque térmico (14 a 19)
- 10 i) a una temperatura superior a la temperatura objetivo si la temperatura objetivo es superior a la temperatura anterior, o de la misma manera
- ii) a una temperatura inferior a la temperatura objetivo si la temperatura objetivo es inferior a la temperatura anterior,
- durante un tiempo necesario para llevar la temperatura del volumen de reacción (4) hasta la temperatura objetivo o cerca de ella; y
- 15 b) poniendo después dichas paredes (6, 8) en contacto con un segundo bloque térmico (14 a 19) a la temperatura objetivo para llevar el volumen de reacción (4) a dicha temperatura objetivo y/o mantener el volumen de reacción (4) a dicha temperatura objetivo durante el tiempo estipulado,
- en el que el primer bloque térmico (14 a 19) se encuentra a una primera temperatura predeterminada constante y el segundo bloque térmico (14 a 19) se encuentra a una segunda temperatura predeterminada constante, es decir, la temperatura objetivo, caracterizado porque las paredes (6, 8) se ponen en contacto directo con dicho primer y dicho segundo bloque térmico (14 a 19) y
- 20 dicho recipiente de reacción (2) empleado comprende también un orificio (10) para introducir una muestra, un canal a través del cual fluye la muestra hacia el volumen de reacción (4), un segundo canal, un volumen de expansión (25), un tercer canal y un segundo orificio (12) a través del cual fluye el aire desplazado por la muestra hacia el exterior del recipiente de reacción,
- 25 en el que dicho volumen de expansión (25) permite la expansión de una mezcla de reacción analítica dentro de dicho volumen de reacción (4) e impide la rotura de dicho recipiente de reacción (2) por el aumento de presión ocasionado por la evaporación durante el calentamiento de dicha mezcla de reacción en el interior del volumen de reacción (4), y
- 30 la transferencia de calor entre el recipiente de reacción (2) y un bloque térmico (14 a 19) se intensifica presionando dichas paredes (6, 8) de dicho recipiente de reacción (2) y dichas paredes de los bloques térmicos (14 a 19) unas contra otras y en contacto directo unas con otras.
2. El procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque se llevan a cabo varios cambios de temperatura del volumen de reacción (4), y más de uno de dichos cambios de temperatura se llevan a cabo usando cada cambio un par de bloques térmicos (14 a 19) consistentes en un primer y un segundo bloque térmico (14 a 19), en el que cada bloque térmico (14 a 19) de cada uno de dichos pares puede ser también un bloque térmico (14 a 19) de uno o más de los otros dichos pares, de acuerdo con las etapas a) y b) de la reivindicación 1.
3. El procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado porque todos los cambios de temperatura del volumen de reacción (4) se llevan a cabo de acuerdo con las etapas a) y b) de la reivindicación 1.
- 40 4. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque la conductividad térmica del segundo material es  $\geq 10$  mW/mmK, preferentemente  $\geq 100$  mW/mmK.
5. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque el segundo material de la segunda pared (8) se selecciona entre el grupo formado por los metales, preferentemente aluminio o cobre.
- 45 6. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque la superficie externa de la segunda pared (8) es aplanada, preferentemente plana.
7. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque la relación del área de la segunda pared (8) que encierra, es decir, el área de la segunda pared orientada hacia, el volumen de reacción (4) con respecto a dicho volumen es  $\geq 0,5$  mm<sup>2</sup>/ $\mu$ l, preferentemente  $\geq 5$  mm<sup>2</sup>/ $\mu$ l.
- 50 8. Un sistema (20) para detectar y/o cuantificar un analito o analitos biológicos y/o químicos en una muestra que supuestamente contenga dicho analito o analitos, que comprende

- i) uno o más recipientes de reacción (2) que comprenden un volumen de reacción (4) cerrado  $\leq 2$  ml, preferentemente  $\leq 50$   $\mu$ l, rodeado por al menos dos paredes (6, 8), una primera pared (6) y una segunda pared (8), siendo dicha primera pared (6) de un primer material que es permeable a al menos una longitud de onda de la luz y siendo dicha segunda pared (8) de un segundo material con una alta conductividad térmica,
- 5 ii) cuatro o más bloques térmicos (14 a 19), y
- iii) unos medios (22) para poner dichas paredes (6, 8) de dichos recipientes de reacción (2) en contacto con cada uno de dichos bloques térmicos (14 a 19),
- en el que una unidad de procesamiento de datos, con un software para la reducción de datos dedicada para dicha detección y/o cuantificación de dicho analito o analitos, está dispuesta para controlar al menos un cambio de temperatura del volumen de reacción (4) desde una temperatura precedente hasta una temperatura objetivo de acuerdo con el procedimiento de la reivindicación 1, caracterizado porque dichas paredes (6, 8) están dispuestas para ponerlas en contacto directo con dichos primer y segundo bloques térmicos (14 a 19), y
- 10 dicho recipiente de reacción (2) empleado comprende también un orificio (10) para introducir una muestra, un canal a través del cual fluye la muestra hacia el volumen de reacción (4), un segundo canal, un volumen de expansión (25), un tercer canal y un segundo orificio (12) a través del cual fluye el aire desplazado por la muestra hacia el exterior del recipiente de reacción (2),
- 15 en el que dicho volumen de expansión (25) permite la expansión de una mezcla de reacción analítica dentro de dicho volumen de reacción (4) e impide la rotura de dicho recipiente de reacción (2) por el aumento de presión ocasionado por la evaporación durante el calentamiento de dicha mezcla de reacción en el interior del volumen de reacción (4), y dicho sistema comprende unos medios para presionar dichas paredes (6, 8) de dicho recipiente de reacción (2) y dichas paredes de los bloques térmicos (14 a 19) unas contra otras y en contacto directo unas con otras.
- 20 9. El sistema según la reivindicación 8, caracterizado porque la conductividad térmica del segundo material es  $\geq 10$  mW/mmK, preferentemente  $\geq 100$  mW/mmK.
10. El sistema según la reivindicación 9, caracterizado porque el segundo material de la segunda pared (8) se selecciona entre el grupo formado por los metales, preferentemente aluminio o cobre.
- 25 11. El sistema según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, caracterizado porque la superficie externa de la segunda pared (8) es aplanada, preferentemente plana.
12. El sistema según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, caracterizado porque la relación del área de la segunda pared (8) que encierra, es decir, el área de la segunda pared orientado hacia, el volumen de reacción (4) con respecto a dicho volumen es  $\geq 0,5$  mm<sup>2</sup>/ $\mu$ l, preferentemente  $\geq 5$  mm<sup>2</sup>/ $\mu$ l.
- 30 13. El sistema según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12, caracterizado porque la primera pared (6) es permeable a la luz visible y ultravioleta (UV).
14. El sistema según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13, caracterizado porque el primer material de la primera pared (6) se selecciona entre el grupo formado por plásticos o vidrios.
- 35 15. El sistema (20) según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 14, caracterizado porque los medios (22) para poner las paredes del recipiente de reacción en contacto directo con los bloques térmicos (14 a 19) comprenden un soporte (24) para dicho recipiente (2) con unos medios (22) para mover dicho soporte (24) en una trayectoria circular o lineal y dichos bloques térmicos (14 a 19) se encuentran en diferentes puntos de dicha trayectoria circular o lineal, de manera que dichas paredes (6, 8) de dicho recipiente de reacción (2) se puedan poner en contacto directo con cada bloque térmico (14 a 19) moviendo dicho soporte (24) a lo largo de dicha trayectoria circular o lineal.
- 40 16. El uso del sistema según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 15 para la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR en tiempo real).
17. El uso del sistema según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 15 para reacciones de amplificación de ácidos nucleicos, preferentemente la amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos (NASBA), amplificación por desplazamiento de cadena (SDA), amplificación por círculo rodante (RCA) y reacción en cadena de la ligasa (LCR).
- 45 18. El uso del sistema según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 15 para ensayos de unión de ligandos.

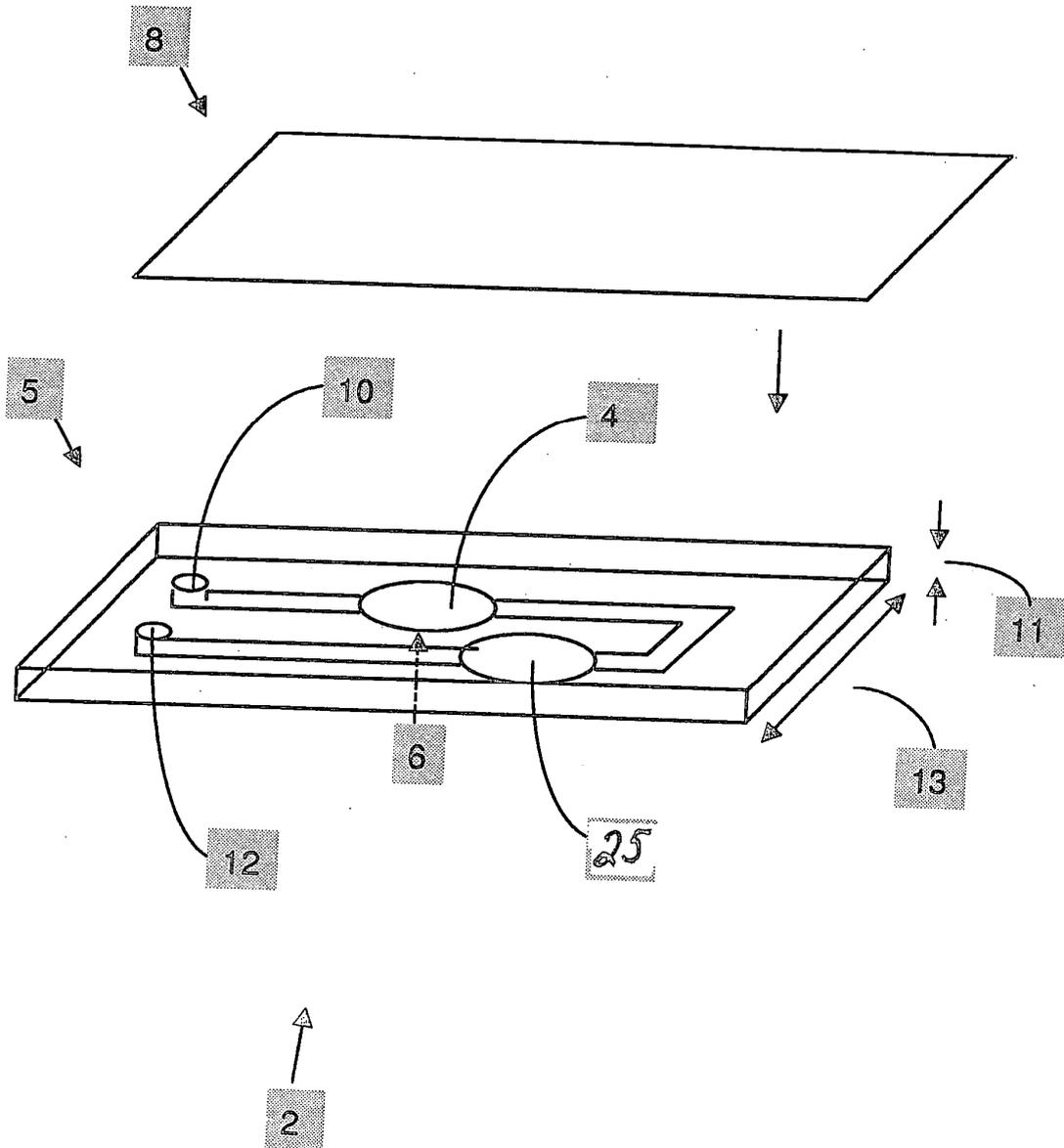


Fig. 1

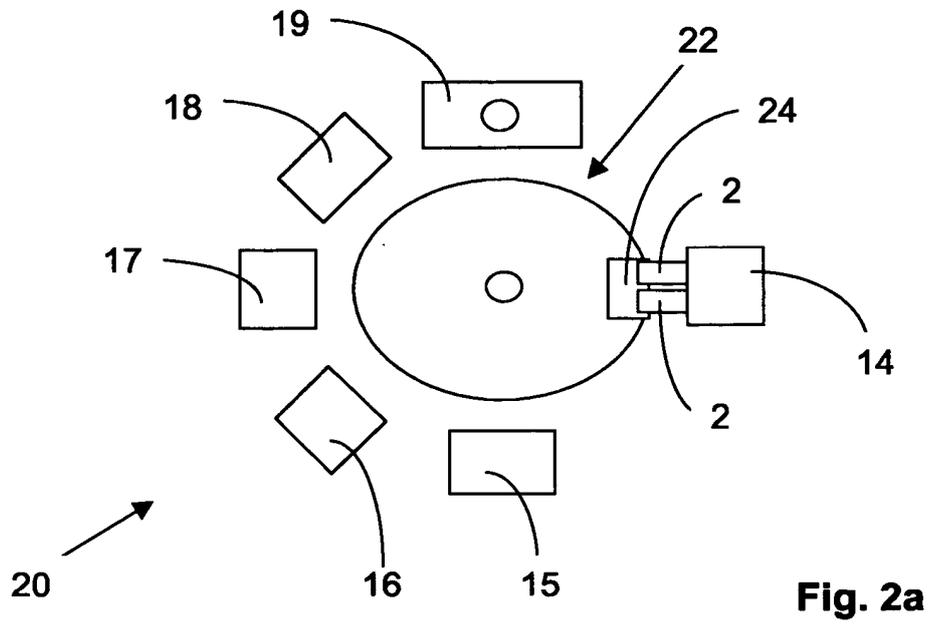


Fig. 2a

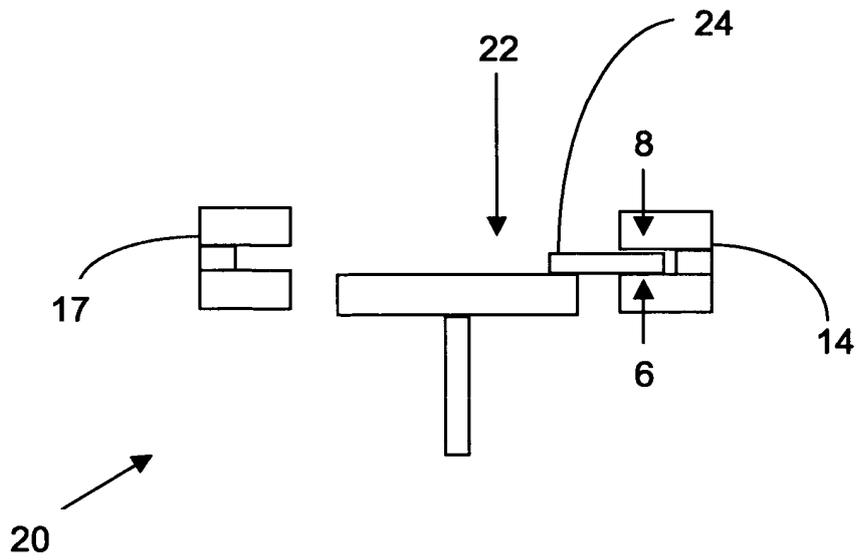


Fig. 2b

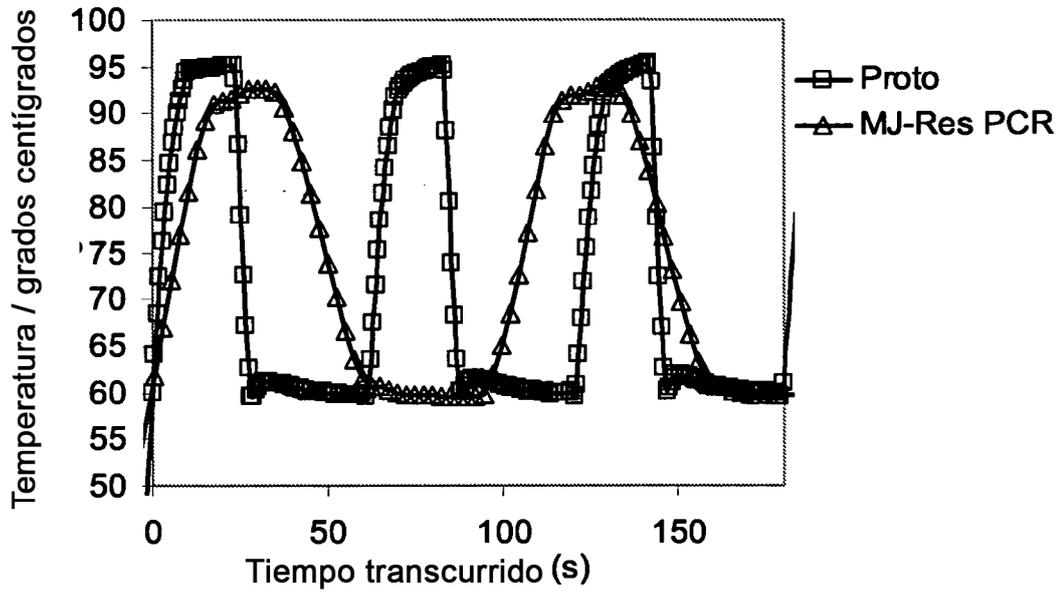


Fig. 3

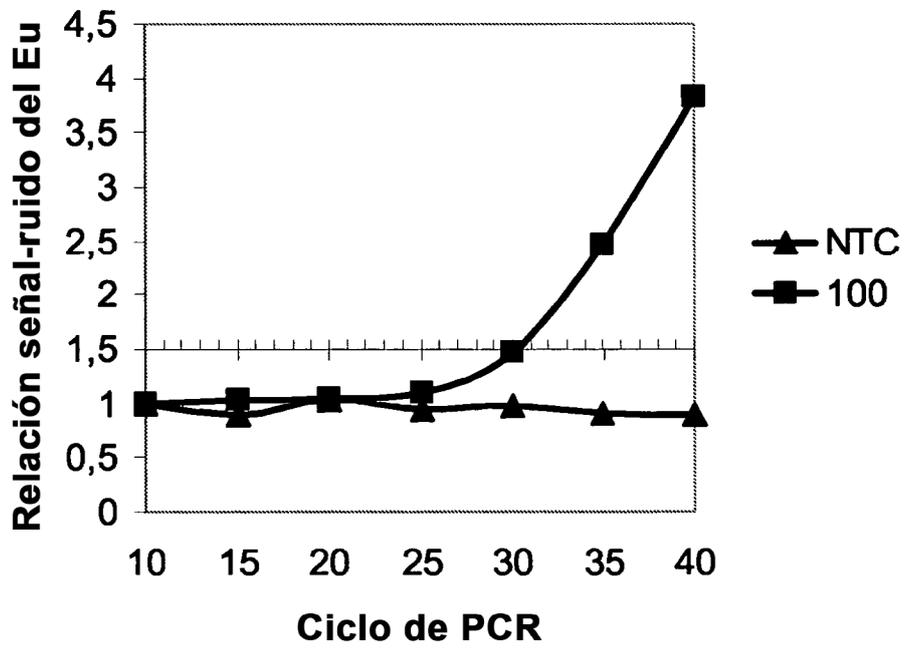


Fig. 4

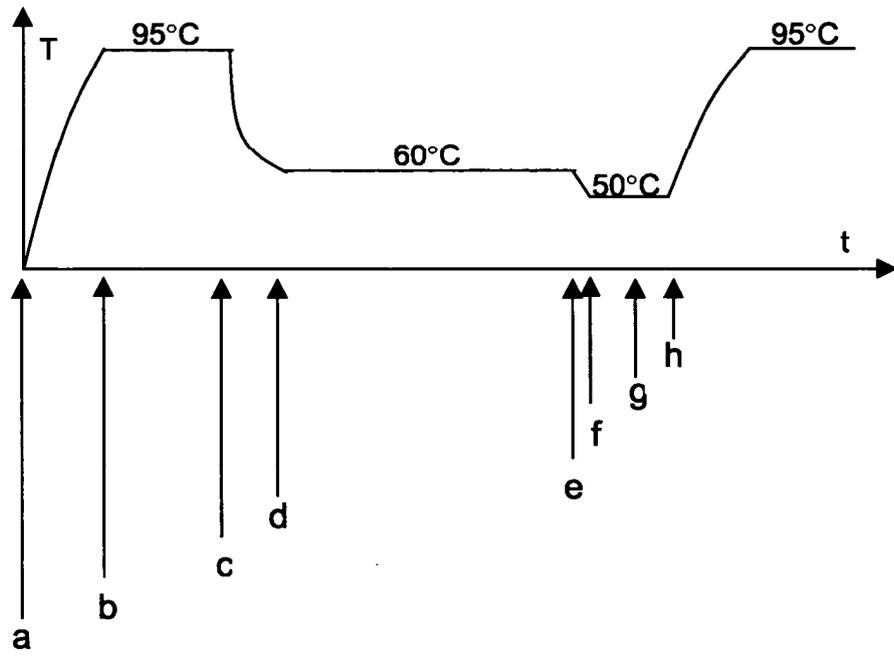


Fig. 5