



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 365 305**

51 Int. Cl.:  
**G01N 1/31** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **98907683 .1**

96 Fecha de presentación : **02.03.1998**

97 Número de publicación de la solicitud: **0963545**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **15.12.1999**

54 Título: **Montaje para reacción química con intercambio de calor e interrogación óptica, y recipiente de reacción.**

30 Prioridad: **28.02.1997 US 808325**  
**28.02.1997 US 808327**  
**28.02.1997 US 808733**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**28.09.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**28.09.2011**

73 Titular/es: **CEPHEID**  
**904 Caribbean Drive**  
**Sunnyvale, California 94089, US**

72 Inventor/es: **Chang, Ronald;**  
**Christel, Lee, A.;**  
**Kovacs, Gregory, T., A.;**  
**McMillan, William, A.;**  
**Northrup, M., Allen;**  
**Petersen, Kurt, E.;**  
**Pourahmadi, Farzad;**  
**Young, Steven, J. y**  
**Yuan, Robert**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 365 305 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

Montaje para reacción química con intercambio de calor e interrogación óptica, y recipiente de reacción

**Campo de la invención**

5 La presente invención proporciona un dispositivo de utilidad en procesos químicos de intercambio de calor y a los procedimientos de fabricación del dispositivo.

**Antecedentes de la invención**

10 Hay muchas aplicaciones en el campo del tratamiento químico en las cuales es conveniente controlar con precisión la temperatura de las sustancias químicas e inducir rápidas transiciones de la temperatura. En dichas reacciones, se intercambia calor entre las sustancias químicas y su entorno para incrementar o reducir la temperatura de las sustancias químicas que reaccionan. De esta manera, el término "intercambio de calor" pretende significar en la presente memoria el calor que puede ser transmitido por una fuente de calentamiento y absorbido por las sustancias químicas o el calor liberado por las sustancias químicas debido a la exposición a una fuente de enfriamiento. A menudo es conveniente controlar el cambio de temperatura de una manera que consiga con precisión la temperatura de referencia, evite quedarse corto o sobrepasar la temperatura, y alcance rápidamente la temperatura de referencia. Dicho control de la temperatura puede impedir reacciones colaterales, la formación de burbujas no deseadas, la degradación de los componentes a determinadas temperaturas, etc., circunstancias que pueden producirse a temperaturas no óptimas. También interesa que sea capaz de observar ópticamente y supervisar la reacción química.

20 El documento US-A-4021124 divulga un recipiente en el cual pueden ser ópticamente observadas pequeñas cantidades de líquidos. El recipiente debe ser precalentado en un dispositivo de precalentamiento y, a continuación, insertado en una abertura de recepción de un dispositivo de medición. El recipiente está destinado a actuar como un almacén de calor, para mantener el líquido en un nivel de temperatura deseado para su medición y observación el mayor tiempo posible.

25 El documento EP-A-0606961 describe un dispositivo de control de la temperatura y un recipiente de reacción constituido por dos hojas flexibles. El documento EP-A-0662345 se refiere a un aparato para el calentamiento de un compartimento de soporte de fluido de una cubeta de reacción. Un reflectómetro es utilizado para analizar el fluido existente en la cubeta de reacción. El documento EP-A-0693560 divulga una cubeta de reacción destinada a un analizador centrífugo.

30 Las aplicaciones destinadas a las reacciones químicas de intercambio de calor pueden abarcar reacciones orgánicas, inorgánicas, bioquímicas, moleculares, y similares. En las reacciones orgánicas e inorgánicas, las sustancias químicas pueden ser calentadas para conseguir una energía de activación para la reacción. Ejemplos de reacciones químicas térmicas incluyen la amplificación isotérmica de los ácidos nucleicos, la amplificación del ciclo térmico, como por ejemplo la reacción en cadena de la polimerasa (RCP) [PCR], la reacción en cadena de la lipasa (RCP) [LCR], la duplicación de secuencias automantenidas, los estudios cinéticos de enzimas, los ensayos homogéneos de unión de ligantes y los estudios mecánicos bioquímicos más complejos que requieren cambios complejos de la temperatura. Así mismo, puede llevarse a cabo la lisis condicionada por la temperatura de microorganismos escogidos como objetivo antes de la amplificación y detección génicas mediante el control de las temperaturas y puede llevarse a cabo en el mismo dispositivo de reacción como etapa de amplificación. Los sistemas de control de la temperatura permiten, así mismo, el estudio de determinados procesos fisiológicos en los que se requiere una temperatura constante y precisa.

40 Se han descrito en la técnica numerosos dispositivos y sistemas para dirigir reacciones de transferencia térmica. Estos dispositivos utilizan una pluralidad de diseños para la transferencia de calor, como por ejemplo baños de agua, baños de aire y bloques sólidos como por ejemplo aluminio. Así mismo, se han descrito reacciones químicas en pequeños volúmenes de reacción.

45 El instrumental convencional, por ejemplo, típicamente consiste en un bloque de aluminio que incorpora hasta noventa y seis pocillos de reacción cónicos. El bloque de aluminio es calentado y enfriado ya sea mediante un aparato de calentamiento / enfriamiento Peltier, o bien mediante un sistema de calentamiento / enfriamiento de líquido en bucle cerrado, que fluya a través de unos canales maquinados dentro del bloque de aluminio. Debido a la gran masa térmica del bloque de aluminio, las velocidades de calentamiento / enfriamiento se limitan, a aproximadamente, 1° C / seg lo que se traduce en unos tiempos de tratamiento más largos. Por ejemplo, la aplicación de la RCP, cincuenta ciclos pueden requerir dos o más horas para su desarrollo.

55 Parte del por qué del bloque de metal de tamaño relativamente grande estriba en proporcionar una masa suficiente para asegurar una temperatura constante y uniforme en cada sitio de reacción, así como de sitio a sitio. Algunos instrumentos de reacción de transferencia de calor incorporan, así mismo, una placa superior, la cual es enfriada y calentada para asegurar una temperatura uniforme a través de la parte superior de todas las soluciones de muestra. Los insertos de muestra son ahusados para potenciar al máximo el contacto térmico entre el inserto y el bloque de metal. Un problema de este sistema es que las grandes masas térmicas que se requieren con vistas a la uniformidad

de la temperatura, necesitan un largo periodo de tiempo (y o una fuente de potencia de calentamiento / enfriamiento de gran tamaño) para calentar y enfriar. La velocidad habitual de calentamiento y enfriamiento para este tipo de instrumentos es del orden de 1 a 3° C / segundo.

5 Típicamente la velocidad de calentamiento más alta que puede obtenerse en instrumentos comerciales es del orden de 3° C / segundo, y las velocidades de enfriamiento son considerablemente inferiores. Con estas velocidades de enfriamiento y calentamiento relativamente lentas, se ha observado que algunos procesos que requieren un estricto control de la temperatura, son ineficientes. Por ejemplo, pueden producirse reacciones en las temperaturas intermedias, creando productos no deseados y colaterales, como por ejemplo “dímeros cebadores” de la RCP o amplicones anómalos, los cuales son deletéreos para el proceso analítico. El control bajo de la temperatura se traduce en un sobreconsumo de los reactivos necesarios para la reacción perseguida.

10 Así mismo, en algunos procedimientos de detección química diagnósticos y medioambientales, el volumen de la muestra no conocida sometida a prueba puede ser importante. Por ejemplo, en la detección de virus en la sangre o en otros fluidos corporales utilizando la RCP, el límite de detección es de aproximadamente 10 viriones. Por consiguiente, se requiere un volumen de fluido mínimo dependiendo de la concentración de viriones en la muestra. A modo de ilustración, en una concentración de 100 viriones / mL, el tamaño de la muestra debe ser de al menos 0,1 mL; para muestras más diluidas, incluso son necesarios volúmenes de muestras mayores. Por consiguiente, el sistema de análisis químico debe diseñarse para manejar una amplia variedad de volúmenes de fluido, desde nanolitros hasta mililitros.

20 Otro elemento fundamental de las muchas reacciones químicas es la supervisión del proceso químico y la detección del producto resultante. La supervisión en tiempo real del proceso a medida que se produce, hace posible la obtención de datos precisos y cuantitativos para determinar el avance de la reacción, y del ajuste en consonancia de los parámetros de calentamiento / enfriamiento. Cuando se dirigen múltiples ciclos, los procesos pueden ser supervisados después de cada ciclo térmico. Después de que la reacción se ha completado, el producto debe ser determinado. En algunos procesos, el producto es separado antes de la detección. Una técnica de detección preferente para el análisis es la interrogación óptica típicamente utilizando fluorescencia, fotosíntesis o quimioluminiscencia. Para ensayos de aglutinación de ligantes, a menudo son utilizadas la fluorescencia de resolución en el tiempo y la polimerización de la fluorescencia.

25 El control de los cambios de calentamiento y enfriamiento pueden ser designados como ciclado térmico. El término “ciclación térmica” pretende significar en la presente memoria al menos un cambio de la temperatura, esto es, un aumento o una reducción de la temperatura, en cuyo entorno las sustancias químicas están expuestas. Por consiguiente, las sustancias químicas que experimentan la ciclación térmica pueden cambiar de una temperatura a otra y, a continuación, estabilizarse a esa temperatura, pasar a una segunda temperatura o volver a la temperatura. El ciclo de temperaturas puede llevarse a cabo una vez o ser repetido tantas veces como sea necesario para la reacción química concreta. Las diversas reacciones químicas que se producen durante estos ciclos de temperaturas son más específicas y más eficientes cuando la temperatura es subida y bajada a las diversas temperaturas de reacción requeridas, lo más rápidamente posible y es controlada con mucha precisión.

### **Dispositivos convencionales para el control de las reacciones en las que intervienen enzimas**

Los dispositivos que controlan la transferencia de calor para las reacciones químicas son aplicables en las reacciones de síntesis, como por ejemplo la RCP de ciclación térmica para aplicar un segmento de ácido nucleico. 40 En esta técnica, una matriz de ADN es utilizada con una polimerasa de ADN termoestable, por ejemplo la polimerasa de ADN Taq, trifosfatos nucleósidos, y dos oligonucleótidos con diferentes secuencias, complementarias a las secuencias que están situadas en las cadenas opuestas de la plantilla de ADN y que flanquean el segmento de ADN que debe ser amplificado (“cebadores”). Los componentes de reacción son sometidos a ciclo entre una temperatura más alta (por ejemplo, 95° C) para la deshibridación de la plantilla bicatenaria del ADN, seguido por 45 temperaturas más bajas (de 40 a 60° C para el recocido de los cebadores y de 70 a 75° C para la polimerización). El sometimiento repetido a ciclos entre las temperaturas de deshibridación, hibridación y polimerización proporciona una amplificación exponencial de la plantilla de ADN.

La amplificación de los polinucleótidos ha sido aplicada a la diagnóstico de los desórdenes genéticos; la detección de las secuencias de ácidos nucleicos de los organismos patógenos en una pluralidad de muestras, incluyendo 50 sangre, tejidos, medioambientales, de transmisión por el aire, y similares; la identificación genética de una diversidad de muestras incluyendo muestras forenses, agrícolas, veterinarias y similares; el análisis de las mutaciones en los oncogenes activados, la detección de contaminantes en muestras, por ejemplo de alimentos; y en muchos otros aspectos de la biología molecular. Los ensayos de amplificación de los polinucleótidos pueden ser utilizados en una amplia gama de aplicaciones, como por ejemplo en la generación de secuencias específicas del ADN bicatenario clonado para su uso en sondas, la generación de sondas específicas para genes no clonados mediante la 55 amplificación selectiva de segmentos concretos de ADNc, la generación de colecciones de ADNc a partir de pequeñas cantidades de ARNm, la generación de grandes cantidades de ADN para la secuenciación del análisis de mutaciones. Se encuentran comercialmente disponibles instrumentos para llevar a cabo la reacción de la cadena de la polimerasa (PCR) mediante sometimiento a ciclos térmicos.

Solo hasta épocas recientes se ha podido contar con parte del instrumental para procesos más novedosos que requieren análisis ópticos en tiempo real después de cada ciclo térmico. Por ejemplo, el instrumento de Perkin Elmer (PE) 7700 (ATC) así como el ciclador térmico PE 9600 se basan en un formato de bloque de aluminio de 96 pocillos, tal y como se describió con anterioridad. La detección por fluorescencia óptica en el PE 7700 se lleva a cabo guiando una fibra óptica hasta cada uno de los 96 sitios de reacción. Un láser central de gran potencia excita secuencialmente cada tubo de reacción y capta la señal de fluorescencia a través de la fibra óptica. Típicamente se requieren complejas guías para los haces de luz y multiplexión óptica.

Un instrumento de sometimiento térmico a ciclo diferente se encuentra disponible en Idaho Technologies . Este instrumento emplea el calentamiento y enfriamiento por aire a presión de portadoras de muestras capilares montadas en un carrusel. El instrumento supervisa cada portadora de muestras capilares en secuencias a medida que las muestras capilares son rotadas pasando por el sitio de detección óptica.

Un tercer sistema de análisis de la PCR en tiempo real, es el dispositivo MATCI desarrollado por el Dr. Allen Northrup et al., tal y como se divulga en la Patente estadounidense No. 5,589,136, incorporada en la presente memoria por referencia. Este dispositivo utiliza una técnica modular para el sometimiento térmico a ciclo de la PCR y para el análisis óptico. Cada reacción se lleva a cabo dentro de su propio manguito de silicio y cada manguito incorpora su propia fuente de excitación óptica asociada y un detector de la fluorescencia. La baja masa térmica del manguito sometido a ciclo térmico hace posible que el dispositivo MATCI desarrolle unas velocidades de calentamiento y enfriamiento rápidas, de calentamiento de hasta 30° C / seg y de enfriamiento de 5° C / seg.

Sin embargo, existen inconvenientes en este dispositivo MATCI en tanto emplea un soporte de silicio micromaquinado de alta conductividad térmica, que incorpora un elemento calefactor directamente depositado sobre el chip micromaquinado de silicio. Los dos inconvenientes de este dispositivo son que el frágil chip de silicio puede resquebrajarse y desportillarse, y existe la dificultad de micromaquinar un chip de silicio de tal forma que un calentador pueda aceptar con precisión un inserto de plástico moldeado ahusado para un contacto térmico optimizado.

Por las razones expuestas anteriormente, la optimización de los procesos de reacción bioquímicos incluyendo el proceso de PCR, requieren que se alcancen lo más rápido posible las temperaturas de reacción deseadas, invirtiendo un tiempo mínimo en temperaturas intermedias. Por consiguiente, el sistema de calentamiento y enfriamiento en el cual la muestra reacciona debe ser diseñado para potenciar al máximo las velocidades de calentamiento y enfriamiento. Así mismo, es conveniente que dicho sistema sea adaptado para permitir la interrogación óptica en tiempo real y para aceptar diversos tamaños de muestras.

### **Sumario**

Se proporcionan un recipiente y un aparato de reacción para llevar a cabo las reacciones químicas de intercambio de calor. El recipiente y el aparato de reacción están diseñados para la transferencia térmica óptima hacia o desde una muestra y para la visualización óptica eficiente de una reacción química de la muestra.

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, el recipiente presenta una cámara para contener una mezcla de reacción, estando la cámara delimitada por dos paredes principales opuestas y una pluralidad de paredes secundarias que unen las paredes principales entre sí. Al menos dos de las paredes que delimitan las cámaras de reacción son transmisoras de luz, para suministrar unas ventanas ópticas a la cámara. El aparato incluye al menos una superficie de calentamiento de contacto con al menos una de las paredes principales y al menos una fuente de calor para el calentamiento de la superficie. El aparato incluye, así mismo, unos elementos ópticos para interrogar ópticamente a la cámara mientras que la superficie de calentamiento está en contacto con al menos una de las paredes principales. Los elementos ópticos comprenden al menos una fuente de luz para transmitir luz hacia la cámara a través de una primera de las paredes transmisoras de luz y al menos un detector para detectar la luz que sale de la cámara a través de una segunda de las paredes transmisoras de luz.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, un aparato para el control de la temperatura de la muestra comprende un recipiente que presenta una cámara delimitada por dos paredes principales opuestas y una pluralidad de paredes secundarias rígidas que unen las paredes principales entre sí.

Al menos una de las paredes principales comprende una hoja o película. El recipiente incluye, así mismo, un orificio para la introducción de fluido dentro de la cámara y un canal que conecta el orificio con la cámara. El aparato incluye, así mismo, al menos una superficie de calentamiento de contacto con la hoja o la película, siendo la hoja o la película suficientemente flexibles para adaptarse a la superficie. El aparato incluye, así mismo, al menos una fuente de calor para el calentamiento de la superficie. El aparato incluye, así mismo, un tapón que puede ser insertado dentro del canal para incrementar la presión de la cámara por medio de lo cual el aumento de presión dentro de la cámara fuerza a la hoja o la película contra la superficie de calentamiento.

Otro aspecto de la presente invención tiene por objeto un recipiente que comprende dos paredes principales opuestas y una pluralidad de paredes secundarias rígidas que unen las paredes principales entre sí para formar una cámara de reacción. Al menos una de las paredes principales comprende una hoja o película, y al menos dos de las

paredes secundarias son transmisoras de luz para proporcionar unas ventanas ópticas a la cámara. El recipiente incluye un orificio para la introducción de fluido dentro de la cámara.

5 Otro aspecto de la presente invención tiene por objeto un recipiente que presenta una cámara de reacción para contener una muestra. El recipiente comprende un bastidor rígido que delimita las paredes secundarias de la cámara. Al menos dos de las paredes secundarias son transmisoras de luz para proporcionar unas ventanas ópticas a la cámara. Al menos una hoja o película está fijada al bastidor rígido para formar una pared principal de la cámara. El recipiente incluye, así mismo, un orificio para la introducción de la muestra dentro de la cámara.

10 Otro aspecto de la presente invención tiene por objeto un recipiente que presenta una cámara de reacción para contener una muestra. El recipiente comprende un bastidor rígido que delimita las paredes secundarias de la cámara. Al menos una hoja o película está fijada al bastidor rígido para formar una pared principal de la cámara. El recipiente comprende, así mismo, un orificio para la introducción de la muestra dentro del recipiente: un canal que conecta el orificio con la cámara y un tapón que puede ser insertado dentro del canal para incrementar la presión dentro de la cámara. En algunas formas de realización, el recipiente incluye al menos dos hojas o películas que son fijadas a los lados opuestos del bastidor para formar dos paredes opuestas de la cámara, siendo cada una de las  
15 hojas o películas suficientemente flexible para adaptarse a una superficie de calentamiento respectiva.

### **Breve descripción de los dibujos**

20 La Figura 1 muestra una vista en perspectiva, parcialmente en despiece ordenado, de un recipiente de reacción de acuerdo con la presente invención, en la que las paredes principales opuestas están suprimidas y se muestra la cámara de reacción interior y en la que un orificio para muestras no está herméticamente cerrado por un capuchón fijado.

Las Figuras 2a, b muestran vistas de un módulo de intercambio de calor con una cámara asociada con un manguito térmico de acuerdo con la presente invención, en la que la Figura 2a muestra el módulo antes de presionar el manguito contra la cámara insertada y la Figura 2b muestra el módulo después de que se ha hecho que el manguito presione contra la cámara.

25 La Figura 3 muestra una vista desde arriba de una cámara de reacción insertada en un manguito térmico con un elemento de calentamiento y una unidad de enfriamiento externo.

30 Las Figuras 4a, b, c, d muestran diversas vistas en perspectiva esquemáticas de otro recipiente de reacción de acuerdo con la presente invención con unas caras principales y secundarias en ángulo para potenciar al máximo la visualización óptica, en las que la Figura 4a muestra una vista lateral del recipiente, la Figura 4b muestra una vista frontal de las superficies externas del recipiente, la Figura 4c muestra una vista frontal del interior de una cámara de reacción con un canal para muestras que comunica con el depósito, la Figura 4d muestra una vista desde arriba del recipiente.

La Figura 5 muestra una vista lateral de una cámara de reacción con unas lentes integrales para la detección óptica y en una disposición asociada con una fuente de emisión de luz externa y un detector.

35 La Figura 6 muestra una vista isométrica de un manguito térmico con una placa de calentamiento fijada a un soporte y, con fines ilustrativos, la otra placa está retirada del soporte.

La Figura 7 muestra otra vista isométrica de un montaje de intercambio de calor con un recipiente insertado en un manguito térmico.

40 Las Figuras 8a, b, c, d muestran diversas configuraciones de enfriamiento y calentamiento de un manguito térmico de acuerdo con la presente invención, en las que las Figuras 8a es una vista desde arriba de los elementos de calentamiento y enfriamiento del manguito, la Figura 8b es una vista frontal de los elementos de enfriamiento mostrados en la Figura 8a, la Figura 8c es una vista frontal de otro manguito con elementos de calentamiento y enfriamiento y la Figura 8d es una vista lateral del manguito mostrado en la Figura 8c.

45 La Figura 9 muestra una vista isométrica de un instrumento de intercambio de calor con un manguito térmico. Un montaje de elementos ópticos acoplado a unos cuadros de circuito, y una unidad de enfriamiento. Un recipiente de reacción se muestra en despiece ordenado desde el instrumento.

Las Figuras 10a, b muestran vistas esquemáticas de un montaje de intercambio de calor que incluye un instrumento con un montaje de elementos ópticos y una unidad de enfriamiento, en las que la Figuras 10a muestra una vista frontal de dicho montaje y la Figura 10b muestra una vista lateral de dicho montaje.

50 Las Figuras 11a, b y c muestran vistas de una agrupación de unidades de montaje de intercambio de calor sobre un soporte de base, en las que la Figura 11a muestra cuatro unidades que se sitúan en contacto con un cuadro de controlador principal, la Figura 11b muestra una de las unidades de la Figura 11a en comunicación neumática y eléctrica con un soporte de base, y la Figura 11c muestra ocho unidades, cada una de las cuales se sitúa en contacto con cuadros de controlador individuales y separados.

### **Descripción detallada**

En general, la presente invención proporciona un montaje de calentamiento y enfriamiento mecánico de masa térmica reducida el cual está adaptado para el rápido calentamiento y enfriamiento de soluciones químicas para llevar a cabo unas reacciones y para la detección eficiente de los productos de la reacción. La masa térmica reducida del sistema asegura el rápido calentamiento y enfriamiento, dado que hay poco material que calentar y enfriar y porque hay una alta relación de la superficie con respecto al volumen para la transferencia térmica. El rápido calentamiento y enfriamiento mejora la eficiencia y reduce la cantidad de reacciones extrañas no deseables y determinadas reacciones pueden llevarse a cabo con unas velocidades elevadas de intercambio térmico.

Los objetivos de la invención consisten en incrementar en gran medida las velocidades de intercambio térmico de los procesos químicos, como por ejemplo de la PCR (velocidades de calentamiento y enfriamiento de hasta 10 X más rápidas) para potenciar al máximo la uniformidad de temperatura de los reactivos, para adaptarse a los altos coeficientes de expansión térmicos para reducir al mínimo el esfuerzo mecánico inducido por la temperatura; potenciar al máximo la eficiencia de la excitación óptica (una longitud de trayectoria óptica larga), para potenciar al máximo la sensibilidad de la detección óptica (potenciar al máximo el volumen de recogida de fotones), para potenciar al máximo la capacidad de detección de fallos, para reducir al mínimo la sobrecarga informática del instrumento central, y para reducir al mínimo el consumo total de potencia del instrumento por medio de cámaras de reacción inteligentes, modulares, independientes, soportadas por una plataforma del instrumental poderosa y una técnica de versatilidad a largo plazo

Los objetivos de la invención se obtienen por medio de un montaje de reacción de enfriamiento y calentamiento independiente con unos elementos ópticos. Cada montaje de intercambio de calor controlado constituye un sitio de reacción único. En conjunto, la unidad de montaje comprende (a) una cámara de reacción, la cual es compatible con un elemento de calentamiento; (b) un manguito térmico que incorpora un calentador integral o unos elementos de calentamiento en los que una porción de la superficie de la cámara de reacción se sitúa en íntimo contacto con una superficie del manguito; y (c) un instrumento para albergar el manguito que presenta un montaje óptico que incorpora unas fuentes de excitación y detección de estado sólido y un sistema de enfriamiento. El instrumento presenta, así mismo, uno o múltiples cuadros de circuito con microcontroladores para supervisar el control de la fuente de excitación y de la fuente de detección de luz y comunica con una computadora central. El montaje de intercambio térmico puede, así mismo, incorporar un soporte con un cuadro de controlador principal que comunica con el instrumento, un manguito y una cámara de reacción para controlar procedimientos tales como los relacionados con la temperatura y el control óptico con los que cada instrumento puede ser controlado de forma independiente o la agrupación de instrumentos puede estar dispuesta bajo un solo conjunto de controles; la dirección de protocolos de autodiagnóstico; y la recepción, almacenamiento y tratamiento de datos.

### **Cámara de intercambio de calor**

La Figura 1 muestra el interior de una cámara de reacción de intercambio de calor de acuerdo con la presente invención, la cual está adaptada para recibir una muestra para su reacción química. La cámara está diseñada para que ofrezca una conductancia térmica óptima y una eficiente visualización óptica de la muestra. La configuración afinada contribuye a la óptima cinética térmica mediante la incorporación de grandes superficies para la conducción térmica y las superficies están adaptadas para situarse en íntimo contacto con elementos relacionados con la temperatura. Así mismo, las paredes secundarias y principales pueden proporcionar unas ventanas al interior de la cámara, de tal manera que el entero volumen de reacción pueda ser ópticamente interrogado. Así mismo, la cámara está indicada para una amplia gama de volúmenes de reacción.

Detallando más los componentes mostrados en la Fig. 1, un recipiente de reacción 2 presenta una carcasa 6 que define un orificio 4 y un canal 8 que conecta el orificio 4 con una cámara de reacción 10. Un capuchón de cierre 12 para cerrar herméticamente el orificio 4 está fijado a la carcasa 6 mediante un brazo flexible 14. El capuchón 12 puede ser insertado dentro del orificio 4 para encajar con el canal 8. Un bastidor de soporte rígido 16 y unas paredes flexibles delgadas 18, mostradas en la Fig. 1 en despiece ordenado desde el bastidor, delimitan la cámara 10, estando las paredes flexibles 18 acopladas a los lados opuestos del bastidor 16. Sobre el bastidor rígido 16 se encuentran unas caras reflectantes 20 las cuales hacen rebotar la luz transmitida desde la cámara 10, haciendo posible una detección incrementada de la señal.

En la utilización del recipiente de reacción 2, una muestra añadida al orificio 4 fluye a través del canal 8 penetrando en la cámara 10. En la cámara 10, la muestra es introducida en las sustancias químicas de reacción. Las paredes principales 18 de la cámara 10 son forzadas a ejercer presión contra los elementos de enfriamiento y calentamiento, por ejemplo, unas placas térmicas. De modo preferente, las paredes 18 se adaptan a la superficie del elemento. La muestra queda expuesta a las variaciones de la temperatura mediante la activación del elemento de calentamiento / enfriamiento. Los productos de la reacción y / o la reacción son visualizados ópticamente.

Las paredes delgadas flexibles 18, las cuales delimitan al menos una porción de la cámara de reacción facilitan la conductancia térmica óptima a las sustancias químicas contenidas en la cámara. La naturaleza flexible de cada pared 18 permite el máximo contacto con una fuente de calentamiento o enfriamiento. La pared es típicamente conformable a la superficie de un elemento térmico externo, de tal manera que la superficie de la pared flexible

- puede adaptar la forma de la superficie del elemento de calentamiento / enfriamiento externo de una manera que evite o reduzca al mínimo los espacios libres entre las dos superficies. Así mismo, la pared flexible continúa adaptándose a la superficie térmica cuando la forma de la superficie pueda cambiar en el curso de la operación de intercambio de calor. Por ejemplo cuando el elemento de calentamiento se expanda debido al aumento de la temperatura, la pared de la cámara se expandirá también para mantener el contacto óptimo con el elemento de calentamiento. Así mismo, si las paredes se expanden debido a un incremento de la presión interna, producida dentro del depósito, las paredes no se hacen rígidas sino que permanecen conformadas a la superficie de calentamiento o enfriamiento. El contacto puede efectuarse haciendo presionar la fuente térmica contra las paredes y / o mediante la presión de las paredes contra la superficie térmica.
- Las Figs. 2a y 2b demuestran el contacto que un recipiente de reacción 46 efectúa con un manguito térmico 32 para formar un módulo de intercambio de calor 30. En la Fig. 2a, el manguito térmico 32 incluye unas placas térmicas 36, 38, las cuales están en posición relajada con una abertura 34 entre las placas. Sin embargo, tal y como se representa en la Fig. 2b, cuando el recipiente de reacción 46 con las paredes flexibles 48 es insertado en la abertura existente entre las placas 36, 38, las superficies 40, 42 de las placas encajan completamente con las paredes 48 de la cámara. En esta posición activada pocos y ningún espacio libre existe entre las superficies de las placas y las paredes 48 de la cámara. Las placas 36, 38 están dispuestas para presionar contra las paredes 48 mediante unos muelles 44. Como alternativa, las paredes 48 de las cámaras están dispuestas para presionar contra las placas térmicas 36, 38. Las paredes conformables 48 de la cámara se moldean de acuerdo con la configuración de las superficies de calentamiento para proporcionar el máximo contacto térmico entre las superficies.
- Además de la capacidad del recipiente de reacción para potenciar al máximo la cinética térmica, las paredes flexibles 48 presentan una masa térmica reducida para permitir la rápida transferencia de calor. La Fig. 3 muestra una vista desde arriba de un recipiente de reacción 50, el cual está en íntimo contacto con los elementos de calentamiento 52 y está rodeado por la cámara de enfriamiento 54. El grosor de cada pared flexible oscila, de modo preferente, entre aproximadamente 0,0025 mm y 0,5 mm, de modo más preferente entre 0,012 mm y 0,12 mm y, como máxima preferencia, entre 0,025 mm y 0,076 mm. Con el fin de conseguir esta finura, la pared puede ser una película, una hoja, o una pieza extruida o fundida, maquinada, moldeada u otra estructura delgada y flexible pertinente.
- El material que compone la pared puede ser un polialcohol incluyendo polipropileno, polietileno, poliéster, y otros polímeros, polímeros laminados u homogéneos, metales o laminados metálicos, u otros materiales que puedan ser delgados flexibles, portables y que permitan una gran transferencia de calor y, de modo preferente, se presenten bajo la forma de una de película u hoja. Cuando el bastidor del recipiente que soporta las paredes esté hecho de un material específico, como por ejemplo polipropileno, las paredes son, de modo preferente, de los mismos materiales, como por ejemplo polipropileno, para que las velocidades de expansión y enfriamiento de las paredes sean las mismas que las del bastidor. Por consiguiente, se reducen al mínimo los esfuerzos indebidos inducidos por el calor o el enfriamiento sobre los materiales, de tal manera que las paredes del manguito mantengan el mismo contacto con el bastidor evitándose el encogimiento de las paredes durante múltiples sometimientos a ciclos de la temperatura.
- Aunque las paredes flexibles son diferentes, en algunas formas de realización, las paredes que contactan con los elementos de calentamiento pueden, así mismo, ser rígidas y planas para comunicar con un calentador rígido y plano. Ya sean rígidas o flexibles, las paredes típicamente constituyen las caras principales de la cámara para posibilitar la máxima exposición al calor o al enfriamiento de las sustancias químicas contenidas en su interior. La cámara, así mismo, presenta una cara secundaria en una pluralidad de caras secundarias que proporcionan un bastidor o soporte de las caras principales.
- Las Figs. 4a, b, c, d muestran otra forma de realización de un recipiente de reacción 60 con unas paredes o caras secundarias de la cámara de reacción 76 en ángulo para potenciar al máximo la visualización óptica. Tal y como se muestra en las Figs. 4a y 4b, cinco caras o paredes secundarias contiguas 62, 64, 66, 68, 70 acoplan entre sí dos caras o paredes principales opuestas 72, 74 para formar la cámara de reacción. Las paredes secundarias 64, 66 están acopladas entre sí formando un ángulo. Tal y como se muestra en la Fig. 4c, las paredes en ángulo 64, 66 pueden delimitar la porción de fondo de la cámara de reacción 76 y las paredes traseras 78 pueden delimitar la porción superior de la cámara. Un canal 80 conduce a la cámara 76. El canal y la cámara que incluyen las paredes traseras pueden, de modo opcional, constituir una pieza separada insertada dentro del cuerpo principal del recipiente de reacción. El canal 80 que conduce a la cámara 76 puede desempeñar una diversidad de funciones incluyendo un conducto para el llenado de la cámara mediante, por ejemplo, un llenado del fondo o la provisión de un área para mantener llenos a rebosar los reactivos y purgado el aire.
- Las paredes en ángulo 64, 66 pueden estar unidas para formar un punto con forma de "V" 82, especialmente sobre el fondo de la cámara 76 para posibilitar un llenado más fácil mediante la reducción o eliminación de la formación de burbujas. Como alternativa, la superficie de contacto de las paredes en ángulo no necesitan conectar para formar un punto, pero pueden estar separadas por una porción intermedia, como por ejemplo otra pared secundaria o diversos elementos característicos mecánicos o fluidicos que no interfieran de modo significativo con las prestaciones térmicas y ópticas de la cámara 76. Por ejemplo, las paredes en ángulo pueden confluir en un orificio que conduzca a otro área de tratamiento en comunicación con la cámara de reacción 76, como por ejemplo un área de electroforesis capilar integrada.

El recipiente de reacción incluye, así mismo, un orificio para añadir líquidos y retirar aire de la cámara 76. El orificio posibilita el acceso de una punta de pipeta a través del canal 80 al interior de la cámara 76, por ejemplo, hasta el fondo de la cámara, para posibilitar el llenado de abajo arriba. El orificio puede, así mismo permitir la introducción de otros procedimientos de toma de muestras convencionales, como por ejemplo por medio de un sistema de inyección de fluido automático o por medio de un colector fluidico que, de modo opcional, forme parte integrante del recipiente de reacción. El recipiente puede, así mismo, ser una cara de un dispositivo mayor que someta a tratamiento el fluido antes de que el fluido fluya a través del orificio y penetre en la cámara. Un ejemplo de un dispositivo mayor es un cartucho fluidico desechable, como por ejemplo el divulgado en la solicitud de Patente estadounidense en tramitación con la patente con el número de serie 08/998,188 depositada el 24 de diciembre de 1997, cuya divulgación se incorpora por referencia en la presente memoria.

El extremo externo del orificio está diseñado para ser cerrado de forma hermética, de modo preferente, mediante la recepción de un capuchón de cierre 84, tal y como se muestra en la Fig. 4d. El capuchón 84 proporciona un medio para cerrar herméticamente el orificio después de su llenado para proporcionar una barrera entre el volumen de reacción interior térmicamente controlado y el entorno no controlado térmicamente para impedir la contaminación de la muestra, para impedir la evaporación de fluido durante el calentamiento de la muestra, y efectos similares. En diversas formas de realización anticipadas por la presente invención, el capuchón puede ser un capuchón de ajuste rápido, una tapa roscada, u otro cierre especial que se necesite para el protocolo analítico seleccionado.

Dicho capuchón puede estar compuesto por cualquier material oportuno, como por ejemplo polipropileno o un elastómero, como por ejemplo Santopreno™ (marca de Monsanto Corporation, ubicada en San Lous, Missouri). En una forma de realización, la cámara puede quedar, así mismo, cerrada herméticamente desde el entorno exterior mediante el calentamiento del material plástico aplicado sobre o que componga la pared secundaria superior. En otra forma de realización, la junta estanca se crea mediante una gota de aceite situada sobre la parte superior de la muestra acuosa para impedir la evaporación de la muestra.

Con referencia de nuevo a la Fig. 1, el capuchón 12 puede, así mismo, ser un tapón que se inserte dentro del canal 8 en comunicación con la cámara de reacción 10, de tal manera que el tapón cree un aumento de presión dentro de la cámara 10. El incremento de presión resultante provoca la expansión hacia fuera de las paredes flexibles 18 para forzar a las paredes contra las unidades de calentamiento externas creando un mejor contacto entre las paredes y los elementos de calentamiento. La presión incrementada puede, así mismo, permitir que una solución existente dentro de la cámara permanezca en estado líquido sin derivar a un estado gaseoso a unas determinadas temperaturas elevadas. Esta propiedad es acorde con el principio teórico  $PV = nRT$ , donde P es la presión, V es el volumen, n son los moles, R es una constante y T es la temperatura.

El recipiente de reacción puede ser configurado para potenciar al máximo la visualización de la reacción dentro de la cámara. Con este fin, una, dos o más paredes secundarias de la cámara comprenden las ventanas ópticas. Cuando existen dos ventanas, una ventana puede servir como orificio de entrada de excitación de luz y la segunda ventana para la detección de la luz emitida desde la cámara de reacción. En otra forma de realización, ambas ventanas sirven para la excitación y detección de dos trayectorias de luz. En la primera trayectoria de luz, la luz es irradiada a través de la primera ventana y detectada a través de la segunda ventana. En la segunda trayectoria de luz, la luz es emitida a través de la segunda ventana y detectada a través de la primera ventana. Las caras de las ventanas pueden estar descentradas en un ángulo seleccionado para potenciar al máximo el proceso de detección.

La Fig. 5 muestra un recipiente de reacción 90 asociado con un sistema óptico 92. El sistema óptico 92 está diseñado para iluminar la pared secundaria transmisora de luz 94 con una radiación de excitación óptica procedente de la fuente de luz individual 98 y para detectar la luz emitida desde la cámara de la pared secundaria transmisiva de luz 96 con el detector 104. Como alternativa, ambas paredes ópticas adyacentes 94, 96 pueden recibir radiación desde unas fuentes respectivas 98, 100 y observación mediante los detectores 102, 104, donde la luz de excitación que es irradiada a través de cada pared tiene una longitud de ondas diferente y la luz detectada en cada pared tiene, así mismo, una longitud de ondas diferente. Trayectorias ejemplares de longitudes de ondas diferentes de la luz de excitación y detección se muestran mediante las flechas de la Fig. 5. Cada una de las paredes 94, 96 puede, así mismo, incorporar unas lentes 106 directamente moldeadas dentro de la superficie para dirigir la luz. La sensibilidad óptica óptima se obtiene mediante la potenciación al máximo de la longitud de la trayectoria de muestreo óptico tanto de los haces de luz que excitan las moléculas químicas como de la luz detectada que es generada para generar la señal óptica.

Cuando la excitación y detección se produce en paredes diferentes, como en la Fig. 5, en general es preferente que las paredes ópticas 94, 96 estén descentradas en un ángulo (A). El ángulo preferente es de aproximadamente 90°. Un ángulo de 90° entre las trayectorias ópticas de excitación y detección asegura que una mínima cantidad de radiación de excitación que entra a través de la pared óptica salga a través de otra pared óptica. Así mismo, el ángulo de 90° permite que una cantidad máxima de radiación emitida, por ejemplo de fluorescencia, sea recogida a través de la ventana de detección. En otras formas de realización, el ángulo existente entre las paredes ópticas existentes es mayor o menor de 90° dependiendo, *inter alia*, de la eficiencia y la sensibilidad de los elementos ópticos de excitación y detección. Por ejemplo, cuando un sistema de detección discrimine de manera eficaz entre la luz de excitación y la emitida, puede desearse un único ángulo de 90° entre las paredes. Por el contrario, cuando un



sistema de detección no consigue discriminar de manera eficaz entre la luz de excitación y la emitida, puede resultar de interés un ángulo mayor de 90°.

5 Uno o más elementos transmisores de luz pueden estar presentes sobre las paredes ópticas. Los elementos ópticos pueden estar diseñados, por ejemplo, para potenciar al máximo el volumen total de la solución que es iluminada por una fuente de excitación de LED, para enfocar una fuente de excitación óptica sobre una zona específica de la cámara de reacción, o para recoger la mayor señal posible de fluorescencia de la mayor fracción posible del volumen de la cámara de reacción. Así mismo, pueden ser utilizadas rejillas para seleccionar longitudes de ondas específicas, filtros para hacer posible que solo determinadas longitudes de onda pasen, y múltiples lentes o filtros potenciados al máximo para fuentes de excitación o detectores múltiples. En otra forma de realización, la pared opuesta puede potenciarse al máximo para recoger y enfocar el porcentaje máximo de la señal de fluorescencia emitida desde la solución hasta un conjunto de fotodetectores. Como alternativa, las paredes ópticas pueden ser ventanas simples, transparentes, planas que sirvan como ventanas ópticamente transmisivas. Otros elementos incluyen lentes coloreadas para proporcionar funciones de filtrado, superficies retrorreflectantes, superficies de rejillas ópticas, etc.

10 Además del recipiente de reacción, las paredes principales o secundarias que delimitan la cámara de reacción pueden ser adaptadas para una interrogación óptica adicional. Las superficies de las paredes pueden ser revestidas o comprender materiales tales como cristal líquido para aumentar la absorción de determinadas longitudes de ondas. Las superficies pueden ser utilizadas para determinar la temperatura de las sustancias químicas incluidas mediante la detección de bandas de absorción concretas que reflejen las condiciones de la temperatura.

20 Películas delgadas de metales, polímeros, y combinaciones de materiales como por ejemplo en laminados, no solo pueden ser empleados en una cámara de reacción para las propiedades estructurales y térmicas, sino también para las propiedades ópticas. Las películas delgadas constituyen materiales que presentan un grosor que oscila entre unos pocos angstroms hasta cientos de micrómetros, y están generalmente formadas con una serie concreta de procesos conocidos por los expertos en la materia de deposición en fase de vapor, deposición en fase de plasma, pulverización magnetrónica y por RF, ablación por láser; etc. Por ejemplo, unas películas delgadas de plata depositadas en fase de vapor pueden aumentar la detección y agrupación de espectros de Raman (dispersión inelástica de una fuente ópticamente excitada). Este y otros materiales pueden ser depositados sobre una variedad de sustratos (vidrio, plástico, silicio, metales, etc.) para que sean translúcidos (transmisores) en determinadas longitudes de ondas en ángulos de incidencia, y reflectantes en otras. Esta es la base de muchos perfeccionamientos de materiales ópticos y de dispositivos tales como divisores del haz dicróico, filtros pasobanda dieléctricos, filtros de densidad neutral, etc.

25 El uso de estas capacidades para fabricar películas pueden ser fijado a, utilizado para cerrar herméticamente los recipientes de reacción, o son directamente depositadas sobre la pared de un recipiente de reacción que será ópticamente interrogado, puede traducirse en unos recipientes de reacción con unas propiedades de emisión y excitación ópticas específicas. Estos procesos de película delgada cuando son utilizados con bajo coste, pueden de esta forma ser utilizados para fabricar recipientes de reacción de poco coste produciendo unos recipientes desechables con unas propiedades ópticas de ajuste preciso.

30 El recipiente de reacción puede ser fabricado de diversas maneras. Puede ser moldeado en varias piezas las cuales sean unidas entre sí o moldeadas por inyección en una sola pieza. Existen varias ventajas en la técnica del diseño y la fabricación en múltiples piezas. Una ventaja es que pueden obtenerse paredes muy delgadas de forma que las paredes puedan ser fabricadas de manera homogénea para que tengan los mismos tamaño y forma. Otra ventaja es que las características ópticas del dispositivo están separadas de las características fluidicas de manera que ambos componentes puedan ser diseñados y realizados de forma óptima de modo independiente. Por ejemplo, las paredes retrorreflejantes pueden fabricarse sobre uno o muchos lados de la cámara para reflejar la luz. Una tercera ventaja es que el componente óptico primario puede ser fabricado con un material diferente que el componente fluidoico primario. Una ventaja adicional es que las superficies principales pueden ser fabricadas a partir de un material diferente de los de algunas o todas las superficies secundarias. Por ejemplo, los materiales con características térmicas óptimas pueden ser diferentes de aquellos con características ópticas óptimas. En particular, las ventanas ópticas en ángulo, con o sin componentes de luz, pueden ser moldeadas a partir de policarbonato, el cual presenta una transparencia óptica satisfactoria, mientras que el resto de la cámara podría ser moldeada a partir de polipropileno, el cual es barato y cuya compatibilidad es conocida con la reacción PCR sensible. Ambas piezas pueden ser unidas entre sí en una etapa secundaria. La ventana óptica es ajustada a presión o unida en un extremo de la cámara, de modo preferente, el fondo de la cámara.

35 El un procedimiento de fabricación de un recipiente de reacción, el bastidor rígido es moldeado para formar una cámara que presenta lados abiertos. El bastidor está fabricado mediante procesos de moldeo por inyección estándar para materiales térmicos. Después de fabricar el bastidor, las paredes principales son fabricadas colocando y, de modo preferente, estirando el material (por ejemplo, películas u hojas de plástico delgado) sobre el área de la cámara. Las paredes son entonces unidas al bastidor. Cuando las paredes son una película o una hoja, el material puede ser fijado mediante termosellado, unión por adhesivo, unión ultrasónica, etc., al bastidor.

Una cámara en la cual las paredes principales y secundarias son fabricadas a partir del mismo material, requiere que el área de superficie total de las superficies principales sean al menos aproximadamente dos veces el área de superficie total de las superficies secundarias, cuando se desea una relación de conductancia térmica de 2:1. Por otro lado, si las paredes están fabricadas con materiales diferentes, es posible modificar la geometría respecto de la mostrada, dado que las paredes principales compuestas por materiales con una gran conducción térmica podrían ser combinadas con las paredes secundarias con una baja conducción térmica. Las paredes pueden ser fabricadas con vidrio o polímeros que incluyen poliacrílicos, poliamidas, policarbonatos, poliésteres, y polímeros de vinilo o cualquier combinación de éstos.

Un inserto separado del bastidor principal del recipiente de reacción puede ser situado dentro del recipiente para delimitar una parte de la cámara u otros elementos internos. El inserto puede ocupar la parte superior de la cámara y proporcionar una parte de las paredes. El inserto puede ser aglutinado, o de modo preferente, encajado a presión dentro del recipiente. El inserto puede, así mismo, proporcionar el canal, el orificio y el medio de fijación del capuchón.

La forma de la cámara puede diferir de acuerdo con la reacción concreta que se está llevando a cabo y con el dispositivo de transferencia térmica asociado. Así mismo, la relación del bastidor con las paredes flexibles puede variar en tanto en cuanto el bastidor esté acoplado a las paredes y las paredes sean accesibles al contacto de una fuente térmica externa. El recipiente de reacción puede tener el tamaño preciso, en particular en la cámara para contener volúmenes de nanolitros hasta mililitros, dependiendo del uso deseado. El volumen de la cámara oscila, de modo preferente, entre 1 y 1000 microlitros, de modo más preferente entre 1 y 500 microlitros y, como máxima preferencia, entre 10 y 100 microlitros.

En resumen, y con respecto al recipiente de reacción, las diversas formas de realización presentan las siguientes características: una elevada relación de superficie a volumen para un eficiente calentamiento / enfriamiento; unas paredes delgadas, de masa reducida; unas paredes principales conformables para potenciar al máximo su asociación con el sistema de calentamiento y enfriamiento; un material moldeable y aglutinable en el que se requieren múltiples piezas; unas características que se adapten a los altos coeficientes de expansión térmica para reducir al mínimo el esfuerzo mecánico inducido por la temperatura mediante las operaciones de intercambio de calor; unos materiales químicamente inertes para que no se produzca adsorción o reacción con reactivos, materias intermedias, o productos, ni desactivación o una desactivación mínima de las enzimas por medios activos de la superficie y que sean compatibles con el glicerol; unas ventanas con una gran claridad óptica para una interrogación eficiente, unas longitudes prolongadas de las trayectorias ópticas de excitación; un descentrado potenciado al máximo entre las ventanas de excitación y emisión; ninguno o un mínimo acoplamiento de luz entre los dispositivos de excitación y detección; unos elementos ópticos, como por ejemplo superficies retrorreflectantes; unas paredes principales que se ajusten de modo preciso con las superficies de calentamiento / enfriamiento, un orificio para la introducción de las muestras y los reactivos; unos medios para incluir o reducir al mínimo el reflujó durante el sometimiento a ciclo; una eliminación eficiente de aire durante el llenado y la colocación del capuchón; y el cierre hermético de la mezcla de reacción respecto del entorno externo.

### **Manguito térmico**

El recipiente de reacción es compatible con un manguito térmico para el calentamiento o enfriamiento de la mezcla dentro de la cámara. El manguito térmico está diseñado para inducir un cambio de temperatura dentro de la cámara estableciendo su íntimo contacto con las paredes de la cámara.

La Fig. 6 muestra una vista parcialmente en despiece ordenado de un manguito térmico 200 con una placa de calentamiento o enfriamiento 202 fijada al puente de soporte 206 y otra placa 204 retirada de la superficie de soporte 206. Cada una de las placas 202, 204 presenta una cara que constituye una superficie de contacto 208 y otra cara que constituye una superficie presionante 210, estando un extremo 212 de cada placa inclinada hacia la otra. Cada superficie presionante 210 puede ser presionada por un muelle 214 con un brazo de fijación integral 216 para su acoplamiento al puente de soporte 206 en una zona de sujeción 218. La placa es parcialmente insertada a través de unas hendiduras 220 del puente y el brazo de fijación 216 de la placa es sujeta a la zona de sujeción 218 al puente. Las superficies presionantes 210 de las placas, presentan, así mismo, una pluralidad de conexiones eléctricas 220, las cuales pueden comunicar con las fuentes de calentamiento, enfriamiento o eléctricas (no mostradas) o con cualquier combinación de éstas. Una vez montadas, las placas son sujetas en oposición mediante el puente de soporte para formar una abertura entre las placas para encerrar una cámara de reacción.

La Fig. 7 demuestra cómo un recipiente de reacción 252 puede ser encerrado dentro del manguito térmico para formar un módulo de intercambio de calor 250. La superficie de contacto 208 de cada placa 202, 204 es forzada a ser presionada contra la superficie de la cámara de reacción de una manera que potencie al máximo el contacto térmico. En general, el manguito puede incluir una o más placas calentadoras separadas cargadas por muelle configuradas para presionar mecánicamente contra la superficie, por ejemplo el área de la cámara, del recipiente de reacción. Dicha configuración cargada por muelle tiene por finalidad simplificar las tolerancias mecánicas entre los diferentes componentes mecánicos, esto es, el manguito térmico, el recipiente y la unidad óptica. Como alternativa, las placas pueden fabricarse para que presionen contra la superficie de la cámara de reacción mediante una fuerza mecánica iniciada por otras partes o por un motor mecánico, por expansión térmica, o por presión neumática, como

por ejemplo una presión por flujo de aire, una presión hidráulica y similares. El interior del manguito de intercambio de calor puede, así mismo, estar ahusado para permitir el ajuste sin huelgo con un recipiente de inserción insertado. Así mismo, las paredes de la cámara insertada son expandidas para presionar también contra las superficies de la placa calentadora.

- 5 La forma del manguito está diseñada para que se produzca un contacto óptico óptimo con una cámara de reacción. En una forma de realización, la abertura del manguito para que se produzca el contacto con las paredes de la cámara, es alargada en la dirección x. De esta manera, la abertura es más larga en la dirección perpendicular con respecto a la longitud de la cámara. De modo preferente, la forma de la abertura es rectangular en sección transversal. La relación de la longitud con respecto a la anchura de las superficies que delimitan la abertura puede ser de al menos 2:1. Dicho alargamiento proporciona un contacto mayor con las paredes de la cámara que en los diseños anteriores en los que la abertura para la inserción se expandía en la dirección z y la abertura tiene típicamente forma redonda o rectangular para sujetar tubos redondos.

- 10 De acuerdo con lo descrito en la presente solicitud, la consecución de un rápido intercambio de calor (calentamiento y / o enfriamiento) a partir de una muestra de un tubo o recipiente de reacción requiere un calentador con una masa térmica reducida junto con un recipiente de reacción ancho, delgado. Los instrumentos más rápidos de sometimiento a ciclos térmicos hasta la fecha resuelven este problema haciendo que el recipiente de reacción sea un cilindro delgado largo, con un diámetro de 1 mm o menos. Otros instrumentos de sometimiento a ciclos rápidos dependen de volúmenes de muestras líquidas muy pequeños, los cuales son relativamente fáciles de calentar y enfriar con rapidez. Sin embargo, estos sistemas son solo adecuados para volúmenes de muestras muy pequeños.

- 15 Frente a ello, el recipiente de reacción descrito en la presente memoria es delgado y ancho, en lugar de incrementar la capacidad del volumen simplemente haciendo que el recipiente de reacción sea más largo, esta solicitud da a conocer que pueden, así mismo, conseguirse grandes velocidades de calentamiento y enfriamiento mediante unos recipientes de reacción adecuadamente diseñados, los cuales son, respecto de los anteriores, delgados y anchos. El diseño de contrapartida y complementario del manguito térmico de masa reducida asegura que el entero montaje, incluyendo los volúmenes de muestras relativamente grandes (hasta y por encima de 100  $\mu$ L), puede ser calentado de manera controlada y enfriada a las máximas velocidades.

- 20 Las placas térmicas pueden ser fabricadas distintos materiales diferentes. Con el fin de asegurar que el interior del manguito de intercambio de calor es resistente a la lejía y a otras soluciones de limpieza, el interior puede ser revestido o cubierto con un material químicamente inerte, como por ejemplo politetrafluoroetileno, o el entero manguito puede ser fabricado a partir de un material químicamente estable, como por ejemplo un material cerámico o metales, como por ejemplo nitruro de aluminio, óxido de aluminio, óxido de berilio, y nitruro de silicio. Otros materiales que pueden ser utilizados incluyen, por ejemplo, arseniuro de galio, silicio, nitruro de silicio, dióxido de silicio, cuarzo, vidrio, diamante, poliacrílicos, poliamidas, policarbonatos, poliésteres, poliimidas, polímeros de vinilo, y polímeros de vinilo halogenados, como por ejemplo politetrafluoroetilenos. Otros posibles materiales incluyen materiales termopar, como por ejemplo cromo-aluminio, superaleaciones, "zircalloys", aluminio, acero, oro, plata, cobre, tungsteno, molibdeno, tántalo, latón, zafiro, o cualquiera de los numerosos metales cerámicos, metales, y materiales poliméricos sintéticos disponibles en la técnica.

- 25 Las placas de cerámica son preferentes porque las superficies interiores pueden ser cómodamente maquinadas para que tengan una gran lisura para que tengan una gran resistencia al desgaste, una gran resistencia química, y un contacto térmico satisfactorio con los recipientes de reacción. Las placas de cerámica, pueden, así mismo, fabricarse muy delgadas (entre 0,63 mm y 1,27 mm) para una masa térmica reducida. Una placa de intercambio de calor fabricada con aluminio o cobre presenta, así mismo, una elevada conducción térmica, pero una masa térmica mayor.

- 30 La fuente de calentamiento, como por ejemplo unos resistores de calentamiento, pueden ser directamente serigrafiados sobre una placa, especialmente las placas que comprenden materiales aislantes de cerámica, como por ejemplo nitruro de aluminio y óxido de aluminio. El serigrafiado proporciona una alta fiabilidad y una sección transversal baja para la transferencia eficiente de calor dentro de la cámara misma. El elemento de calentamiento puede, así mismo, ser cocido dentro de la placa de cerámica. Así mismo, pueden disponerse resistores gruesos de película delgada de diversos patrones geométricos sobre las paredes de la placa para conseguir un calentamiento más uniforme, por ejemplo consiguiendo resistores más gruesos en las extremidades y resistores más delgados en la parte media. Los elementos de calentamiento pueden consistir en carburo, tungsteno, plata u otros materiales que se calientan cuando se aplica un voltaje al material. Una forma de calentar un manguito de metal consiste en la utilización de una fuente de calefactor laminado, como por ejemplo un elemento calefactor de papel metalizado grabado al ácido (Minco Products situada en Minneapolis, MN) fijado a la superficie de las placas de calentamiento.
- 35 De modo opcional, unas aletas de enfriamiento, del mismo o diferente material que el del cuerpo de la cámara, puede ser cobresoldado, estañosoldado o epoxidizado directamente sobre los resistores serigrafiados.

- 40 La función del puente de soporte 206, mostrado en la forma de realización de la Fig. 6, y descrito con anterioridad, consiste en servir como soporte de uno o más elementos de calentamiento o enfriamiento del manguito térmico y para proporcionar una guía para la inserción de la cámara de reacción dentro del manguito térmico. El soporte puede incluir una hendidura para la inserción de la cámara entre las placas térmicas. La hendidura puede incorporar

unos elementos característicos mecánicos o una superficie de estanqueidad que haga posible un cierre mecánico hermético. Una circunstancia a tener en cuenta en la elección del material para el soporte es que el coeficiente de expansión térmica (TCE) coincida con el de las placas térmicas de la forma más estrecha posible. Los materiales de construcción relacionados con anterioridad para la placa son también útiles para el soporte. Combinaciones apropiadas deben resultar evidentes al experto en la materia.

La transición mecánica entre la placa de manguito térmico y el soporte superior constituye una junta crítica. La placa de calentamiento o enfriamiento puede ser sometida a ciclo muchas veces (hasta 400,000 a lo largo de una vida de 5 años), por ejemplo, en aplicaciones de PCR entre aproximadamente la temperatura ambiente, 60° C, y 95° C, mientras el soporte superior puede ser mantenido a una temperatura relativamente constante. Los gradientes térmicos y los esfuerzos son elevados en esta zona. Pueden ser utilizados para asegurar la unión materiales de junta y adhesivos resistentes a las sustancias químicas. Adhesivo preferente es el epoxi, pero puede ser utilizada una técnica de estanqueidad metálica más robusta si la placa térmica es cilíndrica o de material cerámico. Otros criterios para la zona de transición consisten en que el material de estanqueidad o de unión y el procedimiento para unir el soporte superior a la placa térmica debe ser resistente a las lejías y otras soluciones de limpieza. Se espera que puedan producirse hasta 1000 exposiciones a las soluciones de limpieza de por ejemplo un 10% de lejía y 1% de Tween 20.

El manguito térmico de la presente invención presenta una alta conducción térmica y una masa térmica reducida para permitir el rápido calentamiento y enfriamiento. Así mismo, el manguito térmico es lo suficientemente duradero para permitir su uso reiterado (hasta 10,000 inserciones en la cámara de reacción). Los elementos de calentamiento están integrados en el manguito para asegurar el rápido y eficiente calentamiento. Para potenciar al máximo la eficiencia de enfriamiento, los elementos de enfriamiento pueden, así mismo, ser fijados a la superficie, por ejemplo mediante unas aletas de enfriamiento o unos elementos térmicamente conductores conectados a una fuente de enfriamiento secundaria. Por ejemplo, el manguito puede ser térmicamente conectado a un elemento Peltier o a un tubo isotérmico.

Las Figs. 8a, b, c, d ilustran variantes ejemplares de configuraciones de calentamiento y enfriamiento de un manguito térmico. La Fig. 8a es una vista desde arriba que mira directamente abajo hacia la embocadura 262 del manguito 260. El manguito está provisto de unas aletas de enfriamiento 264 y de unos calentadores integrados 266. En esta forma de realización, el manguito está provisto de un revestimiento interior delgado 268. La Fig. 8b es una vista frontal de las aletas de enfriamiento 264 mostrada en las Figs. 8a. La Fig. 8c es una vista frontal de otro manguito 270 con un elemento de calentamiento 276 y unas aletas de enfriamiento 274. Un sensor de la temperatura proporcional al 0 absoluto se muestra en la referencia numeral 272. La Fig. 8d es una vista lateral del manguito 270 que muestra unos elementos de calentamiento serigrafiados o laminados 276 por debajo de las aletas de enfriamiento 274.

Las temperaturas de una cámara de reacción insertada y / o de las placas térmicas pueden ser supervisadas mediante uno o más sensores situados sobre el manguito térmico. Con el fin de conseguir la precisión térmica deseada de 0,5 a 1,0° C, pueden ser utilizados unos sensores térmicos a base de silicio, proporcionales al 0 absoluto (PTAT). La salida de los sensores es linealmente proporcional a la temperatura. Unos sensores de la temperatura PTAT de alta precisión pueden ser muy pequeños, por ejemplo de 0,5 x 0,5 x 1,0 mm. Como alternativa, pueden ser utilizados termistores, termopares y detectores termométricos de resistencia (RTD), especialmente los RTDs hechos de platino, cobre, níquel y níquel - hierro. Estos sensores se fijan fácilmente al borde trasero de la cámara de reacción de intercambio de calor.

El manguito térmico está, así mismo, adaptado para la interrogación óptica de los contenidos *in situ* y puede incorporar diversos elementos característicos como por ejemplo lentes y filtros para facilitar la visualización óptica. En una forma de realización, al menos las superficies del manguito son ópticamente transmisivas, constituyendo, de forma preferente el fondo del manguito adyacente a las zonas ópticas de un recipiente de reacción insertado. Un importante criterio para el material de la ventana es la transparencia o translucencia de la ventana. La ventana, puede, así mismo, ser simplemente una abertura en el manguito a través de la cual la cámara de reacción pueda ser visualizada. En otra forma de realización, el manguito está abierto en el fondo para que una porción de una cámara insertada pueda extenderse por debajo del manguito para una interrogación óptica directa. Cuando la ventana es de un material específico, es preferente que la ventana coincida lo más exactamente posible con los coeficientes de expansión térmica (TCE) del manguito y de la ventana. Por ejemplo, puede ser elegido un vidrio con una TCE que coincida estrechamente con la del manguito cerámico. Una ventana de plástico es más apropiada si el manguito térmico es de metal. El material de la ventana debe, así mismo, ser estable a la lejía y a otras soluciones de limpieza.

La transición mecánica entre la ventana y los elementos térmicos constituye una junta crítica. Es conveniente mantener el paquete de los elementos ópticos a una temperatura relativamente baja, o al menos a una temperatura constante, mientras que el manguito térmico es sometido a muchos ciclos de temperatura de transición. Los gradientes y esfuerzos térmicos son altos en esta zona. Otro criterio para la zona de transición es que cualquiera que sea el material y el procedimiento de estanqueidad de unión para unir la ventana óptica con el manguito térmico debe ser resistente a las lejías y a otras soluciones de limpieza. En particular, se prevé que el interior del manguito térmico sea limpiado de forma periódica introduciendo con una tipeta con soluciones de lejías diluidas, seguido de

agua y después de un alcohol seco. Estas soluciones estarán en contacto directo con la unión existente entre la ventana óptica y el manguito térmico. Esta transición, así mismo, afecta de manera considerable a las funciones de iluminación y de concentración de luz del dispositivo.

#### **Unidad de intercambio de calor del controlador**

- 5 El montaje de los elementos ópticos puede ser fabricado en una unidad que esté configurada para aceptar un manguito térmico. La unidad puede, así mismo, incorporar unos sistemas para el mantenimiento de las temperaturas ambientales, como por ejemplo un sistema de enfriamiento y diversos mecanismos de control para regular las operaciones que se están llevando a cabo dentro del manguito.

10 En la Fig. 9, se muestra una unidad de intercambio de calor 600 con una carcasa 602 y unos elementos operativos asociados. El área de procesamiento 604 está adaptada para aceptar un manguito térmico 630 y un recipiente de reacción 632 descrito *supra*. El área de procesamiento 604 está en comunicación neumática con un ventilador de enfriamiento 606 mediante un canal de entrada 608 y con un canal de salida 610 que conduce desde el área de tratamiento 604 hasta un orificio de salida 612. Cuando el recipiente 632 es insertado dentro del manguito 630 la cámara de reacción es enfriada por el aire de enfriamiento que circula desde el ventilador 606 hasta el canal de entrada 608, hasta el área de tratamiento 604. A continuación, el aire se desplaza por el canal de salida 610 para salir de la carcasa por el orificio 612. Así mismo, la cámara de reacción insertada está en comunicación óptica con un montaje de elementos ópticos 611 que incluye unos bloques de emisión y detección de elementos ópticos acoplados a unos cuadros de circuito 622 para el control de los elementos ópticos.

20 El montaje óptico 620 incluye unos elementos lenticulares, como por ejemplo una luz de colimación, por ejemplo un tubo luminoso y unos elementos de enfoque con unos filtros transmisores y reflectantes, unas rejillas, unos fotodiodos, unas lentes Fresnel y similares, según se necesite, los cuales pueden ser fijados a un cuadro de circuito el cual puede contener unos LEDs y unos fotodetectores. Los componentes lenticulares pueden ser moldeados por inyección a partir de materiales plásticos transparentes, como por ejemplo policarbonato u otro material plástico ópticamente transparente o vidrio. Los elementos lenticulares conectan las ventanas de la cámara de reacción con los elementos ópticos de excitación y detección. Los elementos lenticulares incorporan y se sitúan en contacto con unos filtros y con unos cuadros de circuito 622 de excitación y detección ópticas, los cuales contienen unos LEDs de estado sólido y unos fotodetectores.

25 Los LEDs de estado sólido y los fotodetectores están, de modo opcional, montados sobre un pequeño cuadro de circuito situado por debajo de los componentes lenticulares. Este es un cuadro sencillo, dotado de unos elementos característicos de alineación para situar con precisión las lentes de excitación y los detectores con respecto a los elementos lenticulares y la cámara de reacción. Un conector terminal o un conector flexible proporciona una conexión eléctrica entre el cuadro óptico y el cuadro controlador adyacente.

30 La carcasa 602 puede ser maquinada a partir de aluminio y anodizada, moldeada a partir de un material de plástico rígido, de altas prestaciones, o mediante otras técnicas y materiales convencionales. Las funciones primarias de la carcasa son proporcionar un bastidor para obtener el manguito térmico, el soporte superior, y los montajes ópticos y proporcionar unos canales de flujo y unos orificios para dirigir el fluido de enfriamiento, por ejemplo, el aire, y guiar de manera eficiente el flujo de fluido a través de la superficie del manguito térmico / cámara de reacción.

35 La unidad de intercambio de calor incluye, de modo preferente, una fuente de enfriamiento, como por ejemplo unas placas de difusión de gas u otras estructuras de distribución del flujo de aire, para asegurar un flujo de aire uniforme alrededor del manguito térmico, un ventilador para aplicar aire frío sobre el manguito, un dispositivo Peltier, un líquido de enfriamiento, como por ejemplo agua o una fuente de enfriamiento de gas comprimido, o similares. El elemento de enfriamiento puede formarse directamente dentro de la carcasa o ser fabricado de manera independiente dentro de la carcasa y montado dentro de la carcasa en un momento posterior. Por ejemplo, cada manguito térmico de un conjunto de montajes de intercambio de calor puede comunicar con un elemento de enfriamiento. Así mismo, unos orificios situados dentro de la carcasa pueden proporcionar una entrada de aire de enfriamiento y unos orificios de salida. Los orificios pueden, así mismo, ser cerrados herméticamente a una placa de base utilizando unos obturantes apropiados, en los que los orificios se sitúan en contacto con los orificios de entrada y salida con la placa de base.

40 Las Figs. 10a y 10b muestran una forma de realización alternativa de una unidad de intercambio de calor 650. La unidad 650 incorpora un manguito térmico 670 (mostrado parcialmente en despiece ordenado desde la unidad) con unas placas térmicas fijadas a un soporte superior 674 para que coincidan con la carcasa 652. La carcasa 652 presenta una entrada de aire y un orificio de salida 654, un soporte 656 con unas placas de difusión de aire 658 y un módulo de elementos ópticos 660 con un cuadro de circuito unido 662. La dirección del flujo de aire de enfriamiento se muestra mediante las flechas.

45 El entero control electrónico de cada unidad de intercambio de calor puede ser incorporado dentro de uno o más cuadros de circuito o chips fijados a los lados de la carcasa. En la Fig. 10b, el manguito térmico 670 con el soporte de calor 674 se muestra parcialmente en despiece ordenado fuera de la carcasa 652. El módulo de elementos ópticos 660 y el cuadro de circuito 662 de los elementos ópticos se sitúa en contacto con un par de cuadros de

controlador 644. El cuadro de circuito 662 y los cuadros de controlador 644 pueden ser fabricados utilizando sistemas técnicos de instalación superficial, de bajo perfil y de gran fiabilidad. Los cuadros de controlador 644 comunican con el cuadro óptico a través de una hendidura practicada en la carcasa y con un conector eléctrico situado en un ángulo de 90° en el que el extremo inferior del cuadro de circuito se enchufa en un tomacorriente situado en una placa base para la comunicación eléctrica con el cuadro de controlador.

Así mismo, pueden ser agrupados conjuntamente en múltiples unidades de intercambio de calor, como en los aparatos de reacción convencionales, como por ejemplo la RCP, para exponer en múltiples muestras al mismo perfil de temperatura, en cuyo caso solo una unidad necesita estar equipada con el conjunto de circuitos de control eléctricos. Sin embargo, cuando se desea hacer reaccionar múltiples muestras de manera independiente, entonces se necesita un control independiente de cada unidad o grupo de unidades.

En las Figs. 11a y 11b, una agrupación de unidades de intercambio de calor modulares están dispuestas formando un conjunto. La Fig. 11a muestra una forma de realización de un sistema de intercambio de calor 700 con cuatro unidades modulares 710, una de las cuales se muestra con un panel lateral retirado para dejar al descubierto la unidad interna, sobre un soporte de base 702. La Fig. 11c muestra otra forma de realización de un sistema de intercambio de calor 800 con ocho unidades modulares 810 dispuestas sobre un soporte de base 802. En la Fig. 11a y en la vista en sección transversal mostrada en la Fig. 11b, cada unidad 710 incorpora unos cuadros de circuito de elementos ópticos 712 los cuales se sitúan en contacto con la unidad de comando "madre" 704, por ejemplo un cuadro de controlador único. El cuadro de controlador único incorpora varios, por ejemplo cuatro, cuadros de circuito (no mostrados) de forma que el cuadro procesador "madre" 704 controla la agrupación de unidades 710. Un convertidor de alimentación 706 del sistema suministra potencia a las unidades 710.

Como alternativa, tal y como se muestra en la Fig. 11c, el cuadro de circuito 812 de los elementos ópticos de cada unidad 810 se sitúa en contacto con un cuadro de controlador individual 820 para que cada unidad tenga su propio cuadro de controlador. En la Fig. 11c un manguito térmico 814 con un soporte superior 816, un montaje de elementos ópticos 818 y un cuadro de circuito ópticos 812 se muestran retirados de la base 802. En un formato de conjunto, el espacio libre existente entre las unidades de intercambio de calor pueden ser cerradas herméticamente mediante una placa estanca que cubra el entero conjunto. El soporte superior y la placa estanca pueden estar configurados para formar una superficie al mismo nivel para una configuración multiunidades. El material de la junta es, de modo preferente, resistente a la lejía y a otras soluciones de limpieza.

Con referencia de nuevo a la Fig. 11a, el soporte de base 702 del conjunto de unidades modulares 710 puede desempeñar diversas funciones. Por ejemplo, la base puede permitir la instalación física de las unidades, la carcasa de un cuadro de controlador 704 y una conexión eléctrica entre las unidades y una computadora central. Un conector eléctrico multifuncional puede, así mismo, servir como instalación física.

La zona de reacción de la unidad de intercambio de calor controlada está diseñada para que sea fácilmente montada en un conjunto de 2 dimensiones. Así mismo, la estrecha separación en una dirección hace posible el uso de conjuntos de unidades lineales enlazados, si se desea. En una forma de realización, las dimensiones globales de cada unidad modular son de aproximadamente 9 x 40 x 50 mm. El estrecho tamaño es lo suficientemente pequeño para permitir, por ejemplo, que 8 unidades se agrupen entre sí, si se desea, en una longitud razonable (72 mm), adecuada para su colocación adyacente con unas múltipetas comercialmente disponibles, las cuales presentan una separación de 9 mm de centro a centro para la cómoda carga de la muestra y de las sustancias químicas, si es necesario.

El aparato de reacción térmica puede ser utilizado en muchas aplicaciones. El aparato de reacción puede ser utilizado para llevar a cabo reacciones químicas sobre una muestra, por ejemplo, una reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Cada unidad está provista, ya sea directamente o bien dentro de un recipiente de reacción insertable separado, de unos reactivos requeridos para las reacciones. Por ejemplo, en la realización de una reacción en cadena de la polimerasa, la cámara del recipiente puede incluir un polinucleótido de muestra, una polimerasa, como por ejemplo la polimerasa Taq, trifosfatos nucleósidos, un primer cebador hibridizable con el polinucleótido de la muestra, y un segundo cebador hibridizable con una secuencia complementaria para el polinucleótido. Una parte o todos los reactivos necesarios pueden estar presentes en la cámara de reacción ya montados, o bien pueden ser añadidos a la muestra y a continuación suministrados a través del orificio de entrada hasta la cámara, o bien los reactivos pueden ser descargados sobre la cámara de forma independiente respecto de la muestra. La reacción en cadena de la polimerasa puede llevarse a cabo de acuerdo con procedimientos sobradamente conocidos en la técnica.

Aunque en la presente memoria ha sido descrita la amplificación de los polinucleótidos mediante la reacción en cadena de la polimerasa, debe apreciarse por parte de los expertos en la materia, que los dispositivos y procedimientos de la presente invención pueden ser utilizados de manera igualmente efectiva respecto de una pluralidad de otras reacciones de amplificación de los polinucleótidos y de ensayos de unión de ligantes. Dichas reacciones adicionales pueden ser sometidas a ciclos térmicos, como por ejemplo la reacción en cadena de la polimerasa, o bien pueden ser ejecutados a una sola temperatura (por ejemplo, la amplificación de base secuenciada del ácido nucleico (NASBA). Así mismo, dichas reacciones pueden emplear una amplia diversidad de reactivos de amplificación y enzimas, incluyendo el ADN ligasa, el T7 ARN polimerasa y / o la transcriptasa inversa,

entre otras. Así mismo, la desnaturalización de los polinucleótidos puede llevarse a cabo mediante procedimientos químicos o físicos conocidos, solos o en combinación con un cambio térmico. Las reacciones de amplificación de los polinucleótidos que pueden llevarse a la práctica en el aparato de la invención incluyen, pero no se limitan a : (1) los procedimientos de amplificación de los polinucleótidos escogidos como objetivo, como por ejemplo la réplica de secuencias automantenida (3SR) y la amplificación de desplazamiento de la cadena (SDA); (2) procedimientos en base a la aplicación de una señal fijada al polinucleótido de referencia, como por ejemplo amplificación del ADN de "cadena ramificada"; (3) procedimientos basados en la amplificación de la sonda de ADN, como por ejemplo la reacción en cadena de la ligasa (RCL) y la amplificación de la replicasa QB (QBR); (4) los procedimientos basados en la transcripción, como por ejemplo la transcripción activada por ligazón (LAT) y la amplificación basada secuenciada del ácido nucleico (NASBA); y (5) otros diversos procedimientos de amplificación, como por ejemplo la reacción de la cadena de reparación (RCR) y la reacción de la sonda de ciclación (RSC).

Además de los procedimientos de amplificación de referencia o génicos mencionados con anterioridad, se prevén otras aplicaciones de reacción químicas o bioquímicas. Por ejemplo, la lisis de células a temperatura controlada es otra aplicación de la invención pretendida, la cual puede o puede no llevar a cabo los procedimientos de amplificación génicos o de referencia descritos con anterioridad. En muchos casos, esto se lleva a cabo mediante la elevación de la temperatura de la solución que contiene la célula hasta 37° C durante unos pocos minutos para permitir la acción de las enzimas proteolíticas seguido por la elevación de la temperatura y su mantenimiento a 95° C. Después de unos pocos segundos hasta unos minutos, la célula es sometida a una reacción lítica y el componente de referencia, como por ejemplo el ácido nucleico es liberado y puede, a continuación, ser ulteriormente tratado, por ejemplo, amplificado. En otras aplicaciones, puede ser conveniente detener de manera inmediata cualquier reacción química ulterior después de la lisis haciendo descender la temperatura hasta de 0° a 4° C, como por ejemplo en el supuesto del estudio del estado de la expresión del ARNm utilizando una rápida reacción térmica en cadena de la polimerasa. La rápida elevación térmica, tal y como se ofrece mediante el aparato en cuestión, permite dicha funcionalidad.

Por otro lado, el aparato divulgado puede ser utilizado para controlar e interrogar reacciones químicas. En los estudios cinéticos de enzimas, por ejemplo, es ventajoso mantener la mezcla de la reacción de prueba a una temperatura reducida, por ejemplo de 0° C a 4° C, antes de comenzar la reacción y, a continuación, ajustar rápidamente la mezcla de la reacción desde esta temperatura de mantenimiento reducida, por ejemplo de 4° C hasta una temperatura de reacción óptima. De esta forma se reducen o eliminan las reacciones secundarias no deseadas que se producen a temperaturas intermedias, posibilitando unas mediciones más precisas y una pureza más alta del producto. Así mismo, esta técnica puede extenderse a reacciones químicas y bioquímicas más complejas que puedan ser controladas y estudiadas permitiendo la aplicación de cambios a múltiples temperaturas diferentes, o para reducir periódicamente la temperatura para detener las reacciones.

Dicho control de las temperaturas puede ser explotado para la unión de ligantes, como por ejemplo en inmuno ensayos homogéneos de la fluorescencia. Debido a que el episodio inicial de la reacción puede ser ejecutado de manera precisa y que la subsecuente temperatura de mantenimiento de la reacción puede ser controlada de manera exacta sin gradientes térmicos, pueden conseguirse unas mejores prestaciones de los ensayos. Otras aplicaciones de la invención pretenden quedar incluidas dentro del alcance de la misma cuando esas aplicaciones requieran la transferencia de energía térmica a una reacción química.

La presente invención ha sido descrita en las líneas anteriores con múltiples detalles con referencia a formas de realización concretas y a las figuras. Sin embargo, debe entenderse que pueden llevarse a cabo modificaciones y sustituciones en los dispositivos y procedimientos descritos en base a la presente divulgación, sin apartarse del amplio alcance de la invención. Por consiguiente, el alcance de la invención debe venir determinado por las reivindicaciones y sus equivalentes legales.

## REIVINDICACIONES

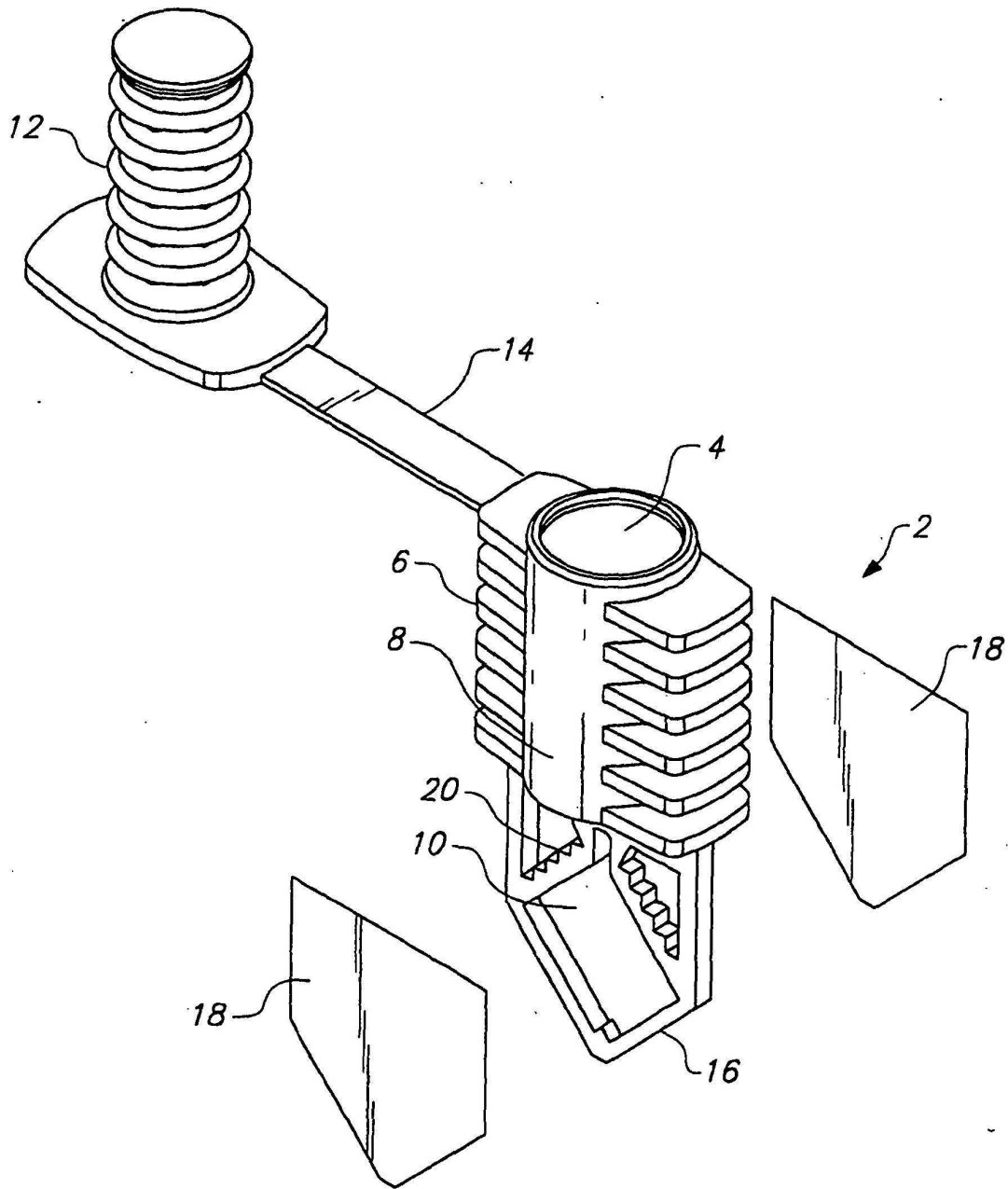
- 1.- Un aparato destinado a calentar y, al mismo tiempo, interrogar ópticamente una muestra, estando el aparato adaptado para recibir un recipiente (2, 46, 60, 90) que contiene la muestra, que incorpora una cámara (10, 76) delimitada por dos paredes principales opuestas (18, 72, 74) y una pluralidad de paredes secundarias (62 - 70) que unen las paredes principales entre sí, siendo al menos dos de las paredes que delimitan la cámara, respectivamente, las primera y segunda paredes transmisoras de luz, para proporcionar unas ventanas ópticas a la cámara, comprendiendo el aparato:
- 5 a) al menos una superficie de calentamiento (40, 42, 208) para que entre en contacto con al menos una de las paredes principales;
- 10 b) al menos una fuente de calor para calentar la superficie; y
- c) unos elementos ópticos para interrogar ópticamente los contenidos de la cámara mientras que la superficie de calentamiento está en contacto con al menos una de las paredes principales, comprendido los elementos ópticos al menos una fuente de luz (98, 100) para transmitir luz a la cámara a través de dicha primera de las paredes transmisoras de luz y al menos un detector (102, 104) para detectar la luz que sale de la cámara a través de dicha
- 15 segunda de las paredes transmisoras de luz.
- 2.- El aparato de la reivindicación 1, en el que la superficie de calentamiento comprende una superficie de una placa (36, 38, 202, 204), y en el que la fuente de calor comprende un resistor de calentamiento acoplado a la placa.
- 3.- El aparato de la reivindicación 2, en el que la placa comprende un material cerámico, y en el que el resistor es serigrafiado sobre la placa.
- 20 4.- El aparato de la reivindicación 1, en el que dicha al menos una superficie de calentamiento está dispuesta como dos superficies de calentamiento definidas por unas placas opuestas situadas para recibir el recipiente entre ellas, de tal manera que las placas entren en contacto con las paredes principales, y en el que los elementos ópticos están situados para interrogar a la cámara a través de las ventanas o aberturas existentes entre las placas.
- 5.- El aparato de la reivindicación 4, que comprende así mismo al menos un soporte (206) para sostener las placas en relación opuesta entre sí, incluyendo el soporte una hendidura para la inserción de la cámara del recipiente entre las cámaras.
- 25 6.- El aparato de la reivindicación 1, en el que la al menos una superficie de calentamiento está provista de un manguito térmico (36, 200, 260, 270, 630) para recibir el recipiente, la fuente de calor comprende al menos un elemento de calentamiento para calentar el manguito, y el manguito incorpora al menos una ventana o abertura que proporciona acceso óptico a las paredes transmisoras de luz.
- 30 7.- El aparato de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que los elementos ópticos incluyen:
- i) dicha fuente de luz como una pluralidad de fuentes de luz y de filtros para transmitir diferentes longitudes de onda de luz de excitación a la cámara; y
- ii) dicho al menos un detector como una pluralidad de detectores y de filtros para detectar diferentes longitudes de ondas de la luz emitida desde la cámara.
- 35 8.- El aparato de la reivindicación 1, en el que:
- i) el aparato incluye al menos dos superficies de calentamiento situadas para recibir el recipiente entre ellas, de tal manera que las superficies de calentamiento estén en contacto con las paredes principales;
- ii) el recipiente incluye:
- 40 un orificio (4) para la introducción de un fluido dentro de la cámara; y
- un canal (8, 80) que conecta el orificio con la cámara; y
- iii) el aparato comprende así mismo un tapón que puede ser insertado dentro del canal para incrementar la presión dentro de la cámara, por medio de lo cual el incremento de la presión fuerza a las paredes principales contra la superficies de calentamiento.
- 45 9.- El aparato de la reivindicación 1, en el que
- i) el aparato incluye dichas al menos dos superficies de calentamiento provistas de unas placas opuestas situadas para recibir el recipiente entre ellas, de tal manera que las placas estén en contacto con las paredes principales;
- ii) la al menos una fuente de calor comprende unos respectivos elementos de calentamiento acoplados a las placas;



- iii) las placas, los elementos de calentamiento, y los elementos y ópticos están incorporados en una unidad de intercambio de calor (600, 650, 710, 810); y
- iv) el aparato comprende así mismo un soporte de base (702) para recibir la unidad de intercambio de calor, incluyendo el soporte de base al menos un controlador para controlar el funcionamiento de la unidad de intercambio de calor.
- 5 10.- El aparato de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el aparato es un termociclador que presenta al menos una fuente de enfriamiento además de la fuente de calor, siendo la fuente de enfriamiento y la fuente de calor operables para someter la muestra en unos ciclos de temperatura.
- 10 11.- El aparato de la reivindicación 10, en el que la fuente de enfriamiento comprende un ventilador para soplar el aire de enfriamiento.
- 12.- El aparato de acuerdo con la reivindicación 9, en el que la unidad de intercambio de calor comprende así mismo:
- i) una carcasa (602) para sostener las placas, unos elementos de calentamiento y unos elementos ópticos; y
- ii) un elemento de enfriamiento dispuesto dentro de la carcasa para enfriar la cámara.
- 15 13.- El aparato de la reivindicación 12, en el que el elemento de enfriamiento comprende un ventilador (606) para soplar el aire de enfriamiento.
- 14.- El aparato de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en el que el soporte de base está construido para recibir y controlar de manera independiente una pluralidad de dichas unidades de intercambio de calor.
- 20 15.- El aparato de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que las al menos dos paredes transmisoras de luz comprenden dos de las paredes secundarias, y en el que los elementos ópticos están situados para transmitir la luz hasta la cámara a través de una primera de las paredes secundarias transmisoras de luz y para detectar la luz que sale de la cámara a través de la segunda de las paredes secundarias transmisoras de luz.
- 25 16.- El aparato de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en el que las paredes transmisoras de luz están angularmente descentradas entre sí formando un ángulo aproximado de 90° y en el que los elementos ópticos proporcionan aproximadamente un ángulo de 90° entre las trayectorias de excitación y detección ópticas.
- 17.- Un recipiente de reacción (2, 46, 60, 90) que comprende:
- a) dos paredes principales opuestas (18; 72, 74), en el que al menos una de las paredes principales comprende una hoja o película;
- 30 b) una pluralidad de paredes secundarias rígidas (62 - 70) que unen las paredes principales entre sí para formar una cámara de reacción (10, 76), en el que al menos dos de las paredes secundarias son transmisoras de luz para proporcionar unas ventanas ópticas respectivas a la cámara;
- c) un orificio para introducir fluido dentro de la cámara.
- 35 18.- El recipiente de la reivindicación 17, en el que la hoja o la película es lo suficiente flexible para adaptarse a una superficie de calentamiento o enfriamiento.
- 19.- El recipiente de acuerdo con la reivindicación 17 o 18, que comprende así mismo un medio de estanqueidad para cerrar herméticamente el orificio.
- 40 20.- El recipiente de la reivindicación 19, en el que el recipiente incluye un canal que conecta el orificio con la cámara y en el que el medio de estanqueidad comprende un tapón que puede ser insertado dentro del canal para incrementar la presión dentro de la cámara.
- 21.- El recipiente de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 20, en el que el recipiente incluye un bastidor rígido que proporciona las paredes secundarias de la cámara, y en el que las dos paredes principales opuestas comprenden dos hojas o películas que están fijadas a los lados opuestos del bastidor rígido, siendo cada una de las hojas o películas lo suficientemente flexible para adaptarse a una respectiva superficie de calentamiento.
- 45 22.- El recipiente de la reivindicación 21, en la que cada una de las hojas o películas comprende un material polimérico.
- 23.- El recipiente de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 22, en el que las paredes transmisoras de luz están angularmente descentradas entre sí.

- 24.- El recipiente de acuerdo con la reivindicación 23, en el que las paredes transmisoras de luz están descentradas entre sí formando un ángulo aproximado de  $90^\circ$ .
- 5 25.- El recipiente de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 24, que comprende así mismo unos elementos o revestimientos ópticos sobre las paredes transmisoras de luz para posibilitar que únicamente determinadas longitudes de ondas de luz pasen a través de las paredes transmisoras de luz.
- 26.- El recipiente de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 25, en el que el recipiente incluye al menos cuatro paredes secundarias que delimitan la cámara, siendo al menos dos de las paredes secundarias las paredes transmisoras de luz, y siendo al menos otras dos de las paredes secundarias paredes retrorreflectantes para reflejar la luz dentro de la cámara.
- 10 27.- El recipiente da cuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 26, en el que la relación de la conductancia térmica de las paredes principales con respecto a la conductancia térmica de las paredes secundarias es de al menos 2:1.
- 28.- El recipiente de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 27, en el que la relación del área superficial de las paredes principales con respecto al área principal de las paredes secundarias es de al menos 2:1.
- 15 29.- El recipiente de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 28, que comprende así mismo unos reactivos situados dentro de la cámara.

20



**FIG. 1**

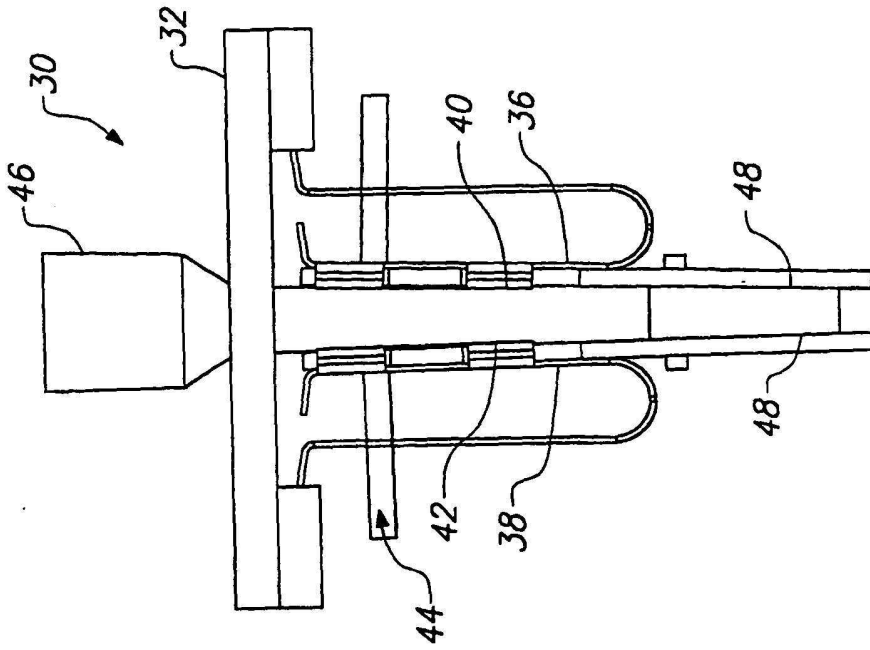


FIG. 2b

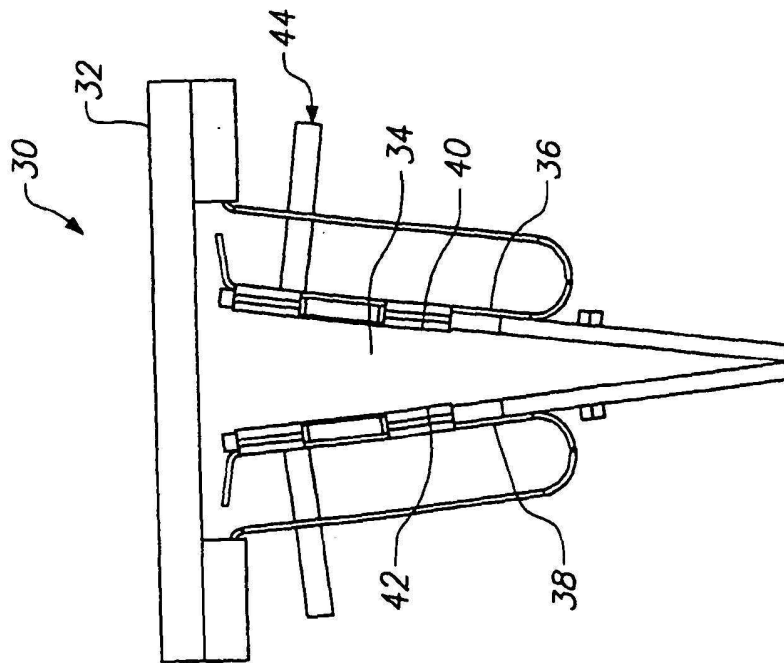
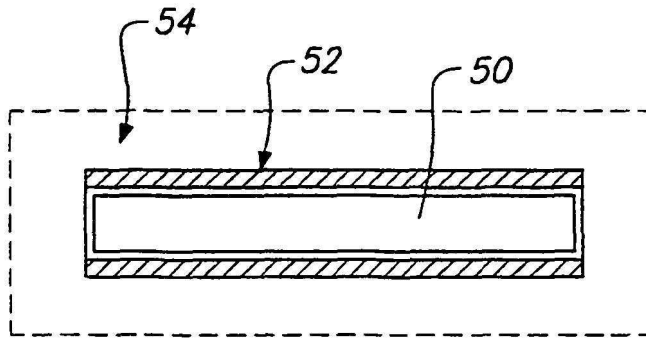
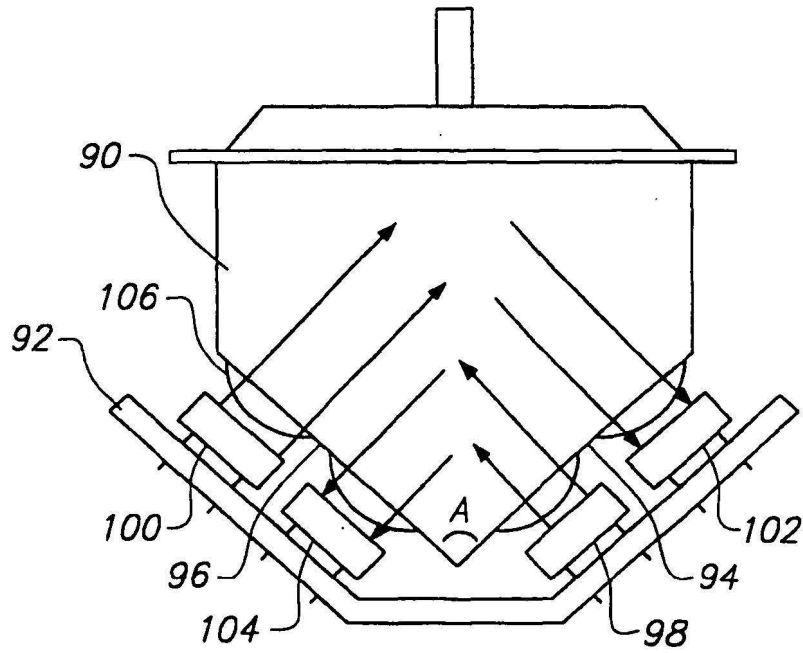


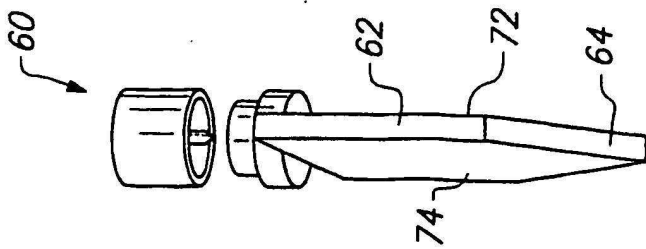
FIG. 2a



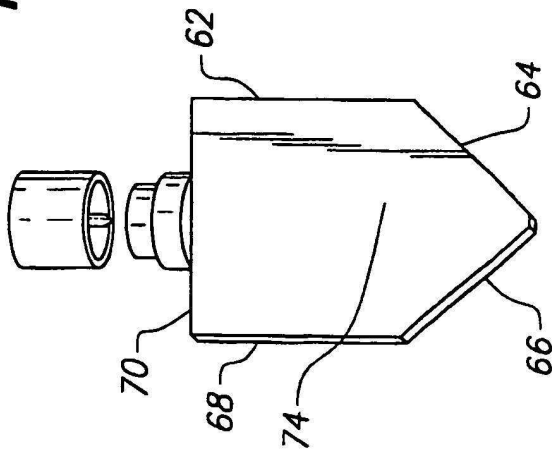
**FIG. 3**



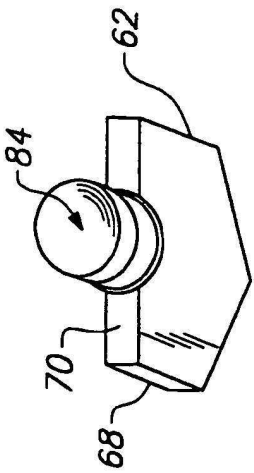
**FIG. 5**



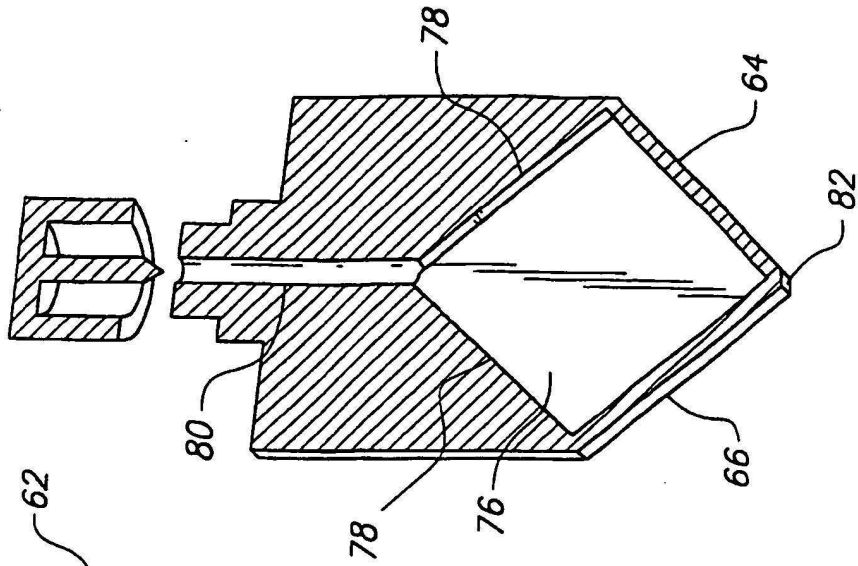
**FIG. 4a**



**FIG. 4b**

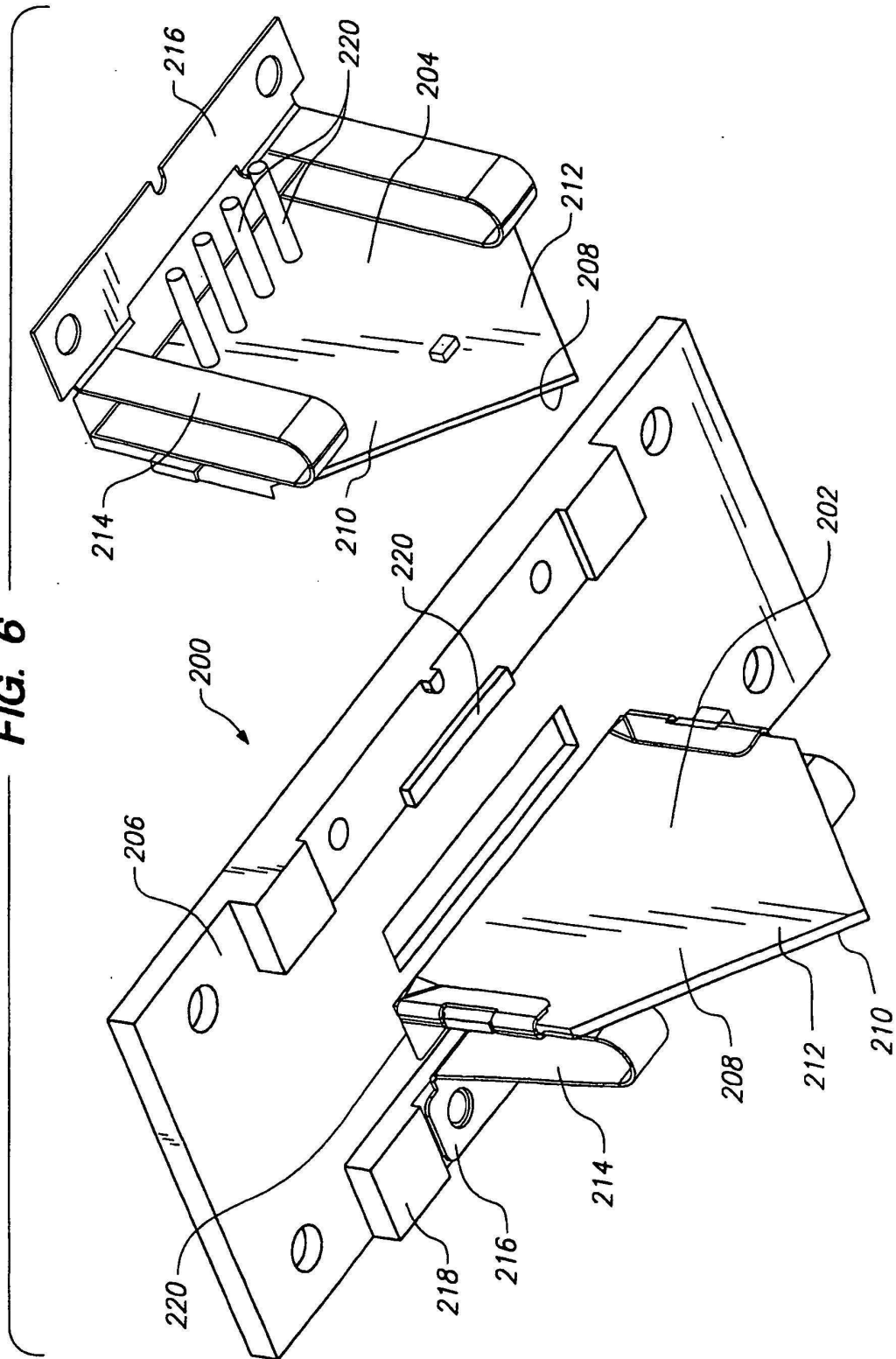


**FIG. 4d**



**FIG. 4c**

FIG. 6



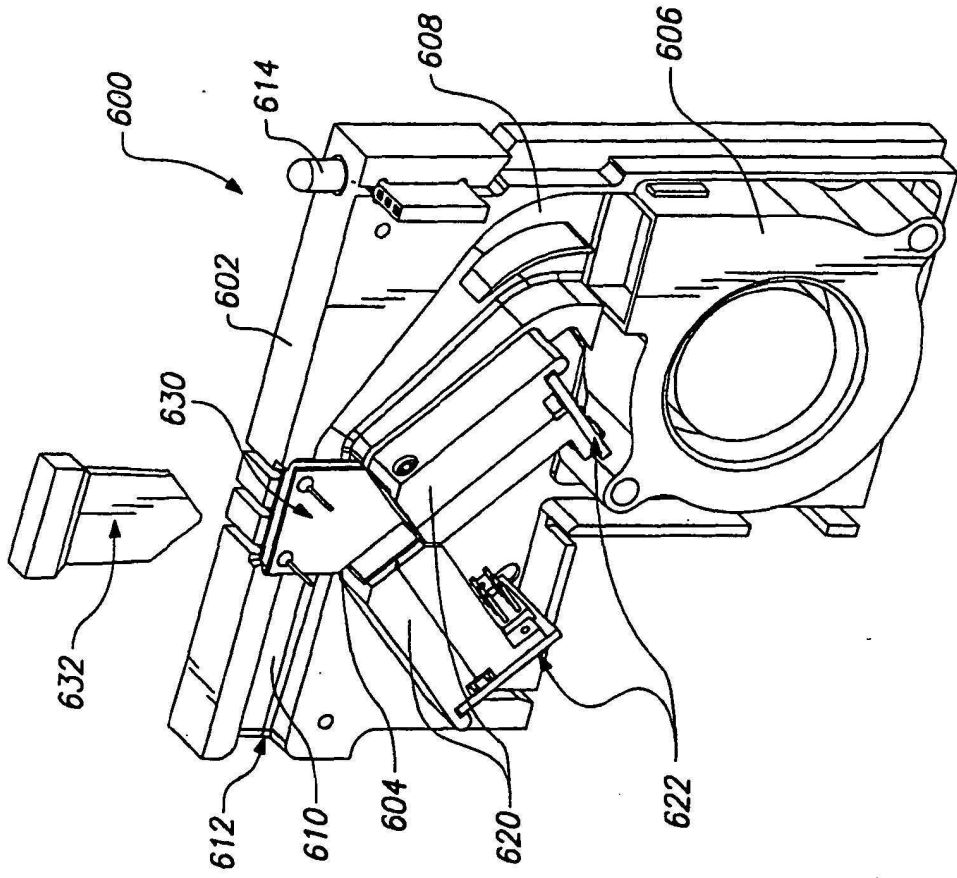


FIG. 9

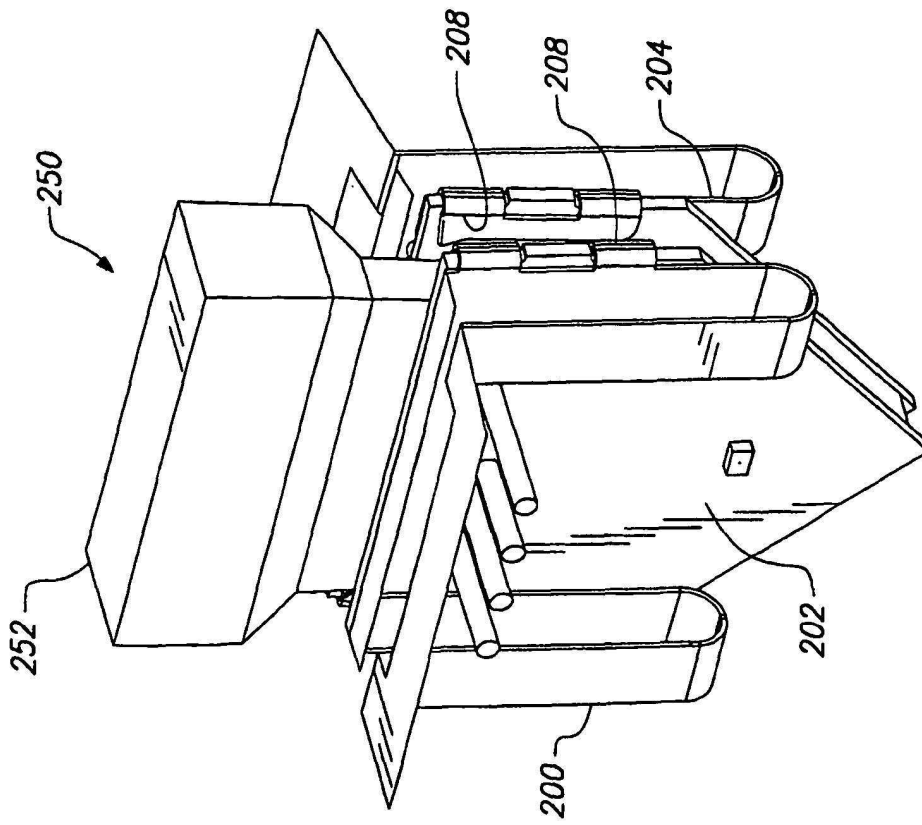
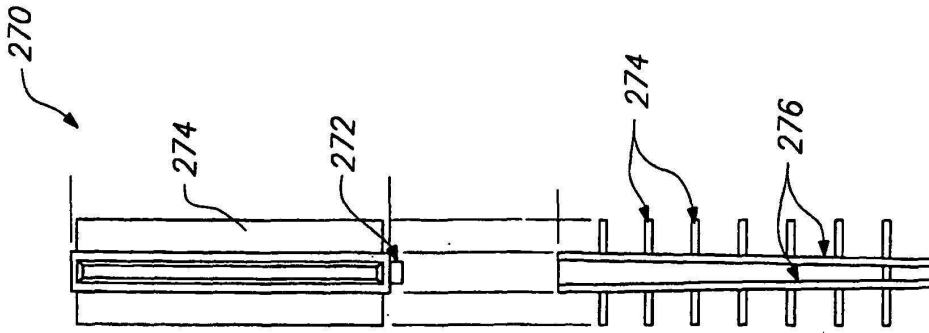
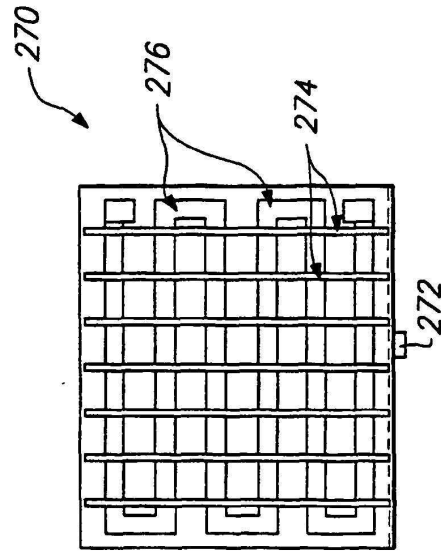


FIG. 7

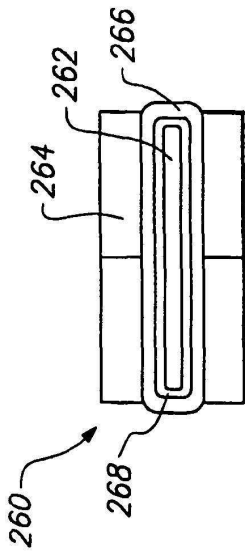




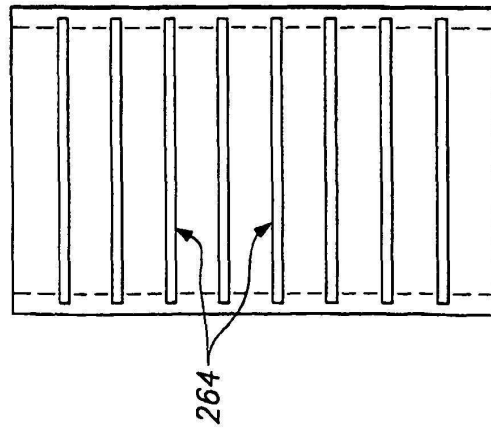
**FIG. 8d**



**FIG. 8c**



**FIG. 8a**



**FIG. 8b**

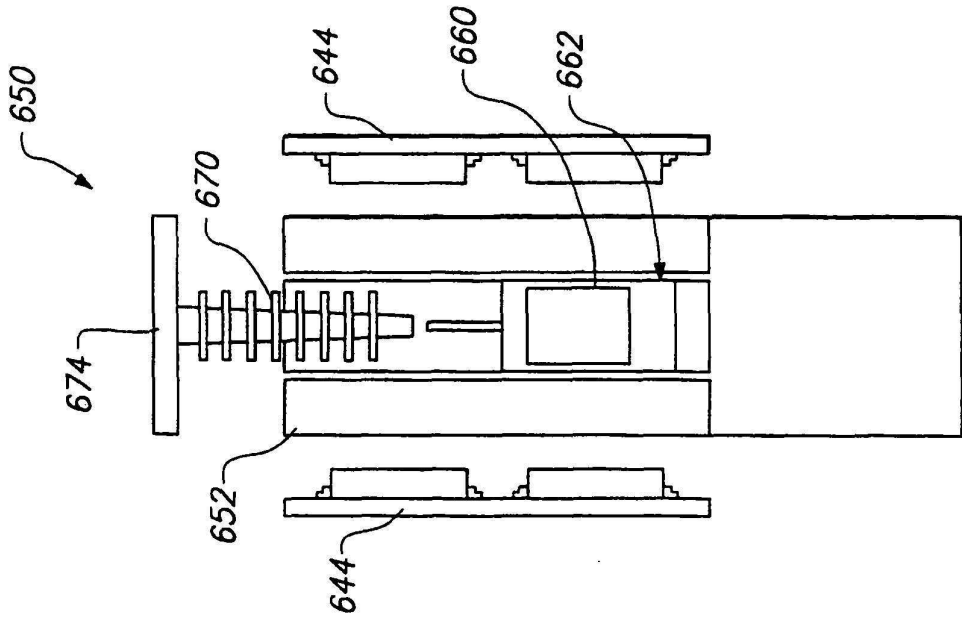


FIG. 10b

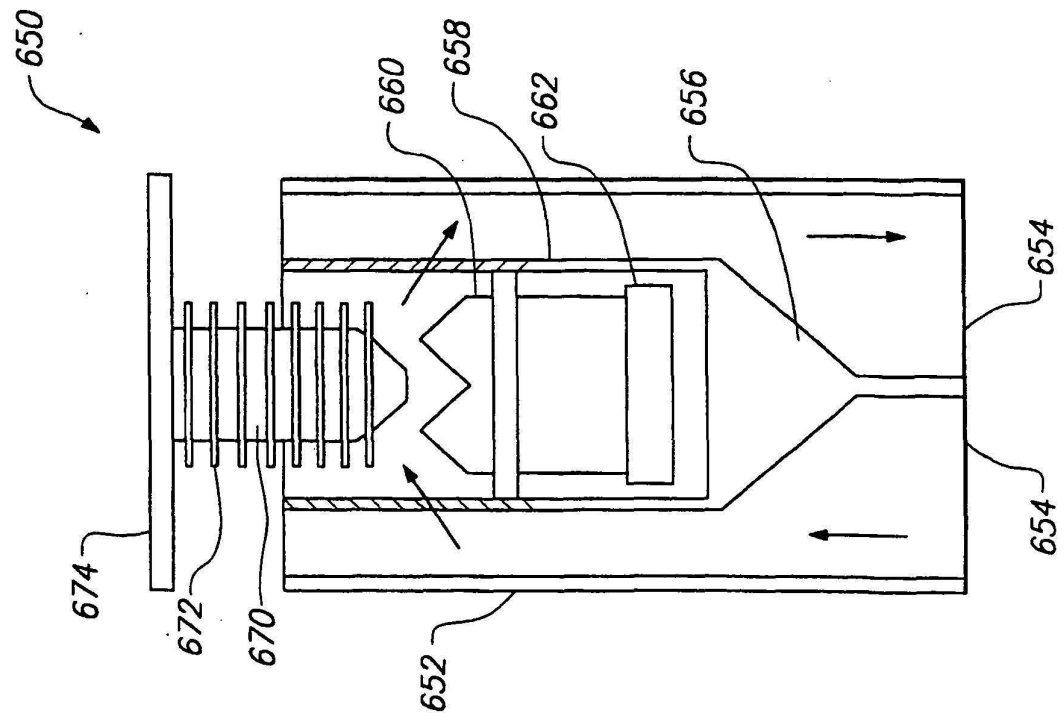
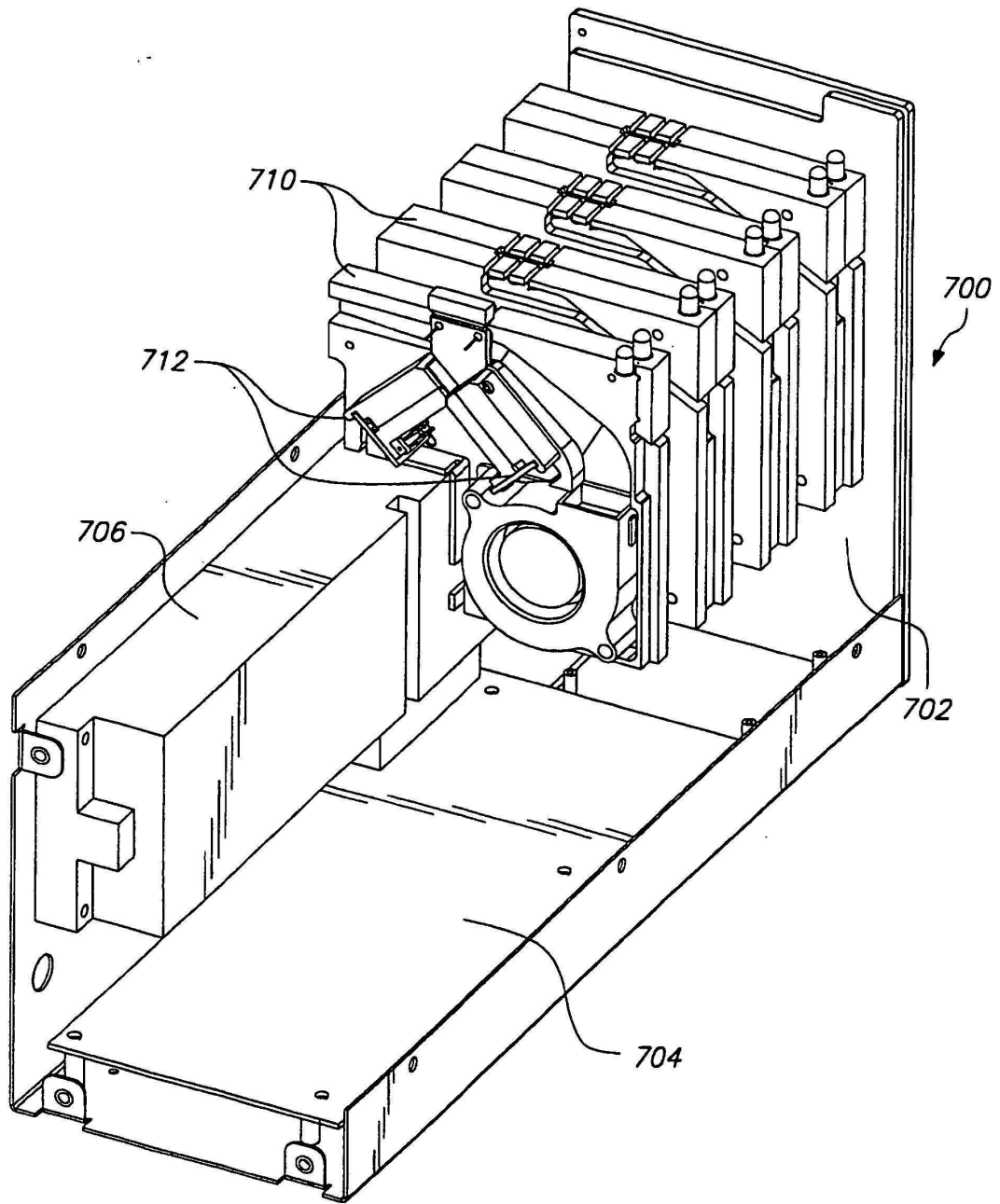
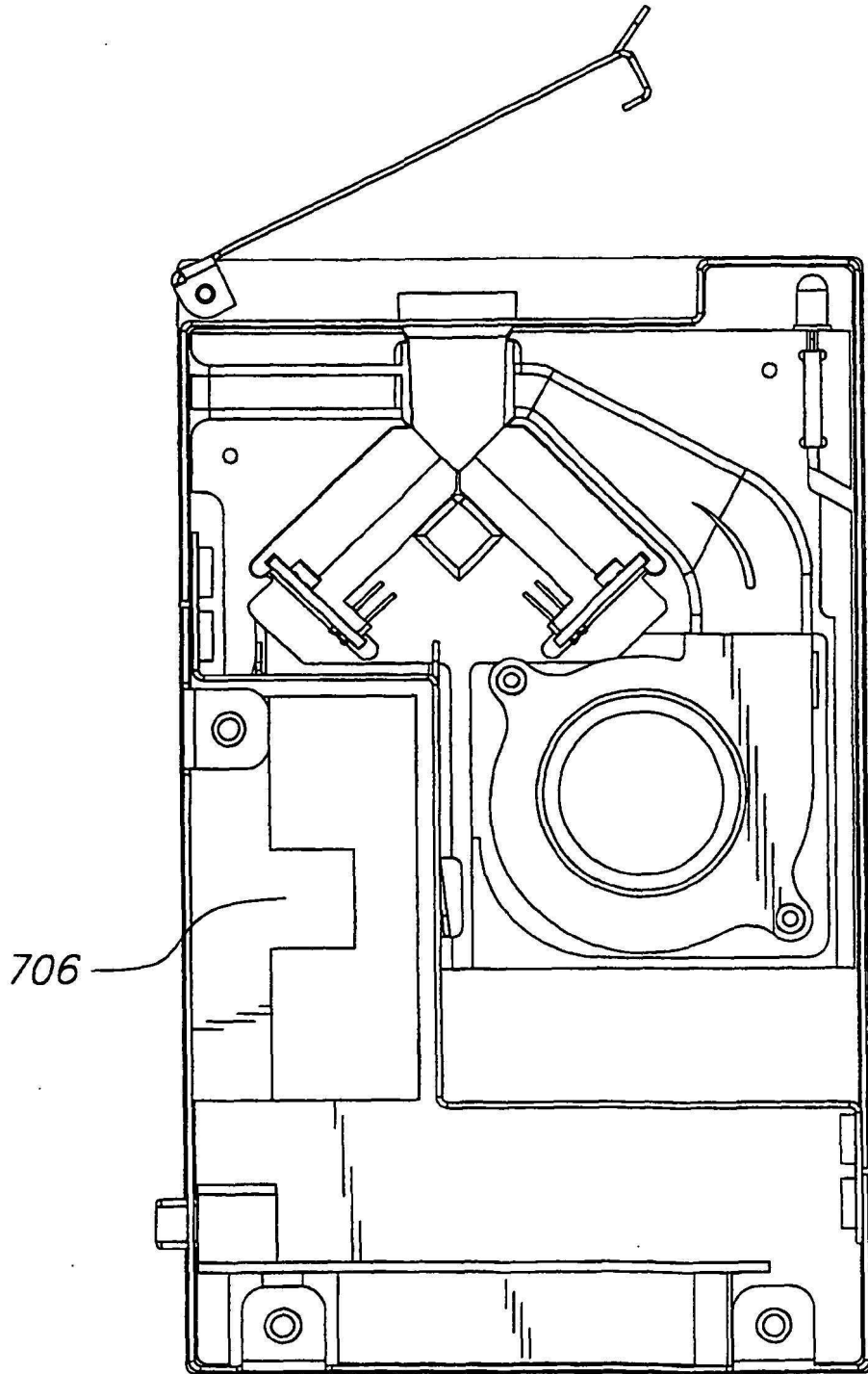


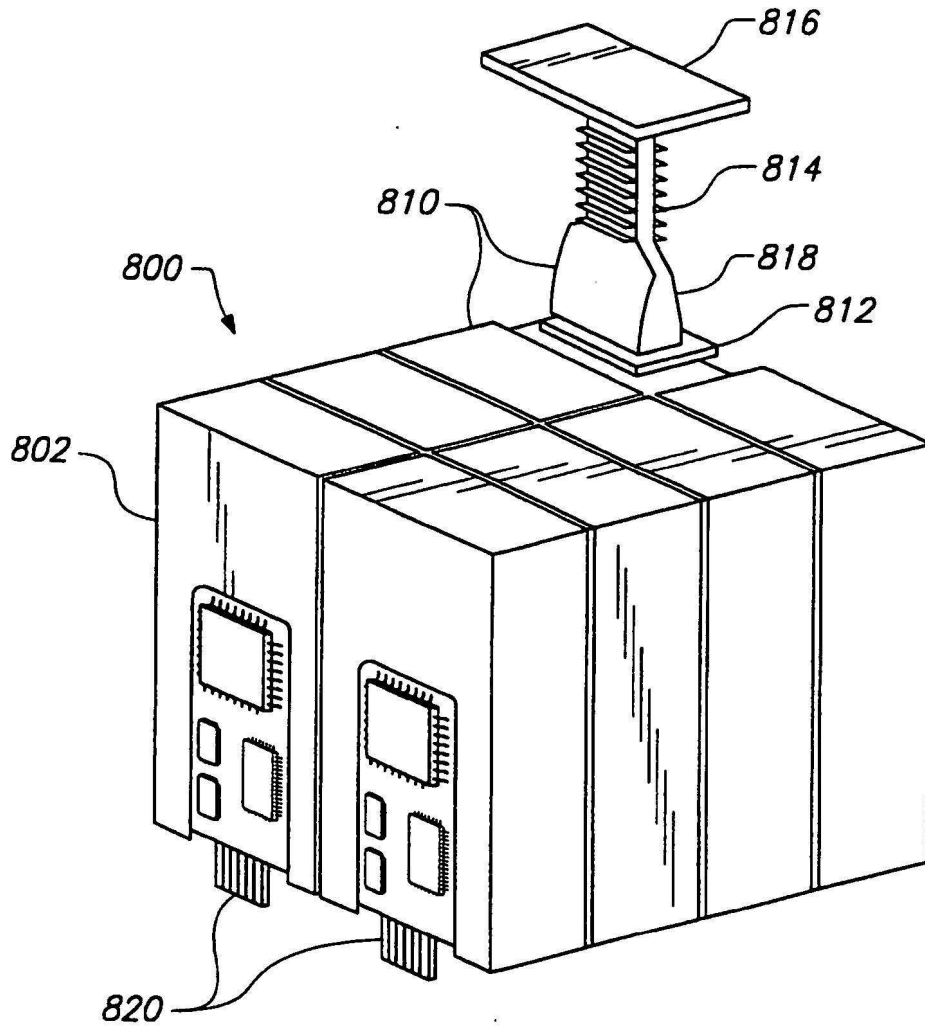
FIG. 10a



**FIG. 11a**



**FIG. 11b**



**FIG. 11c**