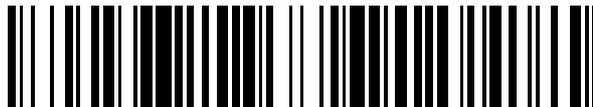


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 370 681**

51 Int. Cl.:

**B01L 7/00** (2006.01)

**G01N 21/64** (2006.01)

**G01N 33/53** (2006.01)

**G01N 33/483** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2006.01)

**B01L 3/00** (2006.01)

**B01L 9/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08788529 .9**

96 Fecha de presentación: **05.09.2008**

97 Número de publicación de la solicitud: **2188056**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **26.05.2010**

54 Título: **APARATO DE CONTROL TÉRMICO PARA REACCIONES QUÍMICAS Y BIOQUÍMICAS.**

30 Prioridad:  
**06.09.2007 US 970401 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**21.12.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**21.12.2011**

73 Titular/es:  
**IT-IS INTERNATIONAL LTD  
1 WAINSTONES COURT STOKESLEY BUSINESS  
PARK  
STOKESLEY, NORTH YORKSHIRE TS9, GB**

72 Inventor/es:  
**HOWELL, James, Richard y  
WEBSTER, Benjamin, Masterman**

74 Agente: **Curell Aguilá, Marcelino**

ES 2 370 681 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

Aparato de control térmico para reacciones químicas y bioquímicas.

5 La presente invención se refiere a un procedimiento y a un sistema para el control térmico de reacciones químicas y/o bioquímicas tales como, pero sin limitarse a, Reacciones en Cadena de la Polimerasa (PCR).

10 Se llevan a cabo muchas reacciones químicas y bioquímicas que requieren variaciones de temperatura controladas con alta precisión. Frecuentemente, dichas reacciones pueden necesitar pasar a través por varios o incluso muchos ciclos de variación de temperatura con el fin de producir los efectos requeridos.

15 Un ejemplo particular de una reacción en la que se requiere un número relativamente grande de ciclos de variación de temperatura controlados con alta precisión es en técnicas de amplificación de ácido nucleico y, en particular, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La amplificación de ADN por reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica fundamental de biología molecular. La PCR es una técnica ampliamente utilizada y efectiva para detectar la presencia de ácidos nucleicos específicos dentro de una muestra, incluso cuando las cantidades relativas del ácido nucleico objetivo son bajas. Así, es útil en una amplia variedad de campos, incluyendo diagnóstico y detección, así como en investigación.

20 El análisis de ácido nucleico por PCR requiere preparación de la muestra, amplificación y análisis del producto. Aunque estas etapas se realizan usualmente de forma secuencial, la amplificación y el análisis pueden ocurrir de manera simultánea.

25 En el curso de la PCR, se amplifica un ácido nucleico objetivo específico por una serie de reiteraciones de un ciclo de pasos en el que los ácidos nucleicos presentes en la mezcla de reacción se desnaturalizan a temperaturas relativamente altas, por ejemplo a 95°C (desnaturalización), y a continuación la mezcla de reacción se enfría a una temperatura a la que cebos de oligonucleótidos cortos se fijan al ácido nucleico objetivo de una sola hélice, por ejemplo a 55°C (recocido). A continuación, los cebos se extienden utilizando una enzima de polimerasa, por ejemplo a 72°C (extensión), con lo que se ha replicado la secuencia de ácido nucleico original. Los ciclos repetidos de desnaturalización, recocido y extensión dan como resultado el aumento exponencial en la cantidad de ácido nucleico objetivo presente en la muestra.

35 Son posibles variaciones de este perfil térmico, por ejemplo estableciendo ciclos solamente entre las temperaturas de desnaturalización y recocido o modificando una o más temperaturas de ciclo en ciclo.

Pueden añadirse tintes de ADN o sondas fluorescentes a la mezcla de PCR antes de la amplificación y utilizarse para analizar el progreso de la PCR durante la amplificación. Estas mediciones cinéticas permiten la posibilidad de que pueda cuantificarse la cantidad de ácido nucleico presente en la muestra original.

40 La vigilancia de la fluorescencia durante cada ciclo de PCR implicaba inicialmente el uso de un fluoróforo en forma de un tinte de intercalación tal como bromuro de etidio, cuya fluorescencia cambiaba cuando se le intercalaba dentro de una molécula de ácido nucleico de doble hélice, en comparación a cuando está libre en solución. Estos tintes pueden utilizarse también para crear curvas de punto de fusión, ya que la vigilancia de la señal fluorescente que producen cuando se calienta un ácido nucleico de doble hélice hasta el punto de que éste se desnaturaliza, permite que se determine la temperatura de fusión.

50 Vigilando el cambio en la fluorescencia del tinte cuando progresa la PCR (y progresará sólo si está presente inicialmente en la muestra al menos algo ácido nucleico objetivo), puede vigilarse el cambio de volumen en la cantidad de ácido nucleico presente en la mezcla de reacción. Este tipo de sistema se describe, por ejemplo, en el documento EP-A-512334. En este sistema, la fluorescencia se mide una vez por ciclo como una medición relativa de concentración de producto. Además, el número de ciclos en el que se detecta primero un incremento en la fluorescencia aumenta de manera inversamente proporcional al registro de la concentración de plantilla inicial.

55 Se han desarrollado otros sistemas fluorescentes que son capaces de proporcionar datos adicionales concernientes a la concentración y la secuencia de ácido nucleico. En muchos de estos sistemas, se incluyen sondas marcadas de forma fluorescente que son oligonucleótidas que se hibridizan específicamente con la secuencia amplificada en lugar del tinte de intercalación o además de éste.

60 Ejemplos particulares de un sistema de este tipo están comercialmente disponibles como el sistema "Taqman"<sup>TM</sup>, pero hay muchos otros que incluyen ejemplos específicos como se expone en los documentos WO/9746707A2, WO/9746712A2, WO/976714A1, todos ellos publicados el 11 de diciembre de 1997, cuyo contenido completo se incorpora aquí por referencia.

65 En estos sistemas más complejos, se incorporan en el sistema de reacción más de un fluoróforo, generalmente en forma de marcas fluorescentes. Por ejemplo, en el sistema Taqman<sup>TM</sup>, se añade al sistema una sonda que lleva dos marcas fluorescentes. La señal fluorescente procedente de las marcas es interactiva utilizando transferencia de

- energía por fluorescencia (FET), un tipo particular de la cual es la transferencia de energía resonante por fluorescencia (FRET), de modo que la luz emitida desde una marca (el donante o reportador de energía) sea absorbida por la otra marca (el aceptor o extintor de energía) cuando estas dos están en estrecha proximidad una a otra en la sonda. Las sondas están diseñadas para ser recocidas a la secuencia amplificada u objetivo durante la fase de extensión de cada ciclo de la PCR. La enzima de polimerasa utilizada en esta reacción es una que tiene una actividad de 5'-3'-exonucleasa y, por tanto, cuando se encuentra la sonda durante la extensión, es digerida por la enzima. Esta digestión da como resultado la separación de las dos marcas, lo que significa que ya no pueden tener lugar la FET o la FRET y las señales resultantes de las marcas cambian como resultado de ello.
- En estos sistemas el análisis de una muestra ocurre actualmente con la amplificación en el mismo tubo dentro del mismo instrumento. Este enfoque combinado reduce la manipulación de la muestra, ahorra tiempo y reduce en gran medida el riesgo de contaminación del producto para reacciones posteriores, ya que no es necesario retirar las muestras de sus recipientes cerrados para un análisis adicional. El concepto de combinar amplificación con análisis de producto se ha llegado a conocer como PCR en "tiempo real".
- Sin embargo, el hecho de que estos sistemas produzcan señales complejas y frecuentemente solapadas a partir de múltiples fluoróforos diferentes dentro del sistema significa que se requiere una resolución de señal compleja para determinar la intensidad de la señal a partir de los fluoróforos individuales.
- La complejidad se agrava además porque las PCR son conducidas generalmente en cicladores térmicos específicamente contruidos, tales como calentadores de bloques, que acomodan múltiples recipientes de reacción al mismo tiempo. A continuación, estos se someten conjuntamente a ciclos y se vigilan las señales producidas por cada recipiente.
- Por supuesto, se utilizan señales visibles procedentes de tintes o sondas en diversos otros tipos de reacciones y la detección de estas señales puede utilizarse en una variedad de maneras. En particular, pueden permitir la detección de la incidencia de una reacción que puede ser indicativa de la presencia o ausencia de un reactivo particular en una muestra de ensayo, o proporcionar información sobre el progreso o la cinética de una reacción particular.
- Cuando se utilizan más ampliamente estos tipos de reactivos, la manera en que se utilizan llega a ser cada vez más compleja. En muchos casos, una mezcla de reacción puede contener más de un reactivo de "señalización" de este tipo y puede que las señales procedentes de estos necesiten ser detectadas o vigiladas con el tiempo a fin de proporcionar un conjunto completo de información sobre la incidencia, naturaleza o progreso de una reacción particular.
- Los sistemas actuales para la fluorimetría de PCR confían frecuentemente en sistemas de detección tales como detectores monocromos (detectores CCD, fotodiodos, PMT, CMOS, etc.) que, por sí mismos, sólo detectarán la presencia o ausencia de luz, pero no pueden distinguir entre luz de diferentes bandas de onda o colores. Por tanto, no son capaces de diferenciar directamente entre las diversas señales de fluoróforos diferentes. Este problema se aborda frecuentemente teniendo unos medios externos de separación o filtración de luz en diferentes bandas de onda para detección en diferentes puntos en el detector o en diferentes momentos en el tiempo.
- Estos medios externos incrementan el coste, el tamaño y la complejidad del instrumento. Tales medios externos necesitan con frecuencia montarse con precisión para el alineamiento óptico y esto tiende a reducir la robustez del instrumento o lleva a un mayor tamaño, peso y coste asociados al montaje. Específicamente, dichos medios externos incluyen grupos de filtros móviles, en donde múltiples filtros se combinan de tal manera que un actuador físico puede posicionar uno de los filtros enfrente del detector monocromo, permitiendo la detección de una banda de onda particular.
- Otros sistemas utilizan un conjunto de filtros fijo o una rejilla de difracción para producir bandas de onda independientes, pero en este caso las bandas de onda son separadas espacialmente en el detector y esto elimina la capacidad del sensor de detectar simultáneamente emisiones procedentes de una disposición de recipientes bidimensional completa. Esto conlleva a la necesidad de proporcionar un sistema de exploración u otro sistema móvil para dirigir emisiones desde diferentes recipientes hasta el detector o para mover los recipientes alineándolos con el detector.
- Muchas de tales reacciones químicas o bioquímicas tienen lugar en un aparato con un número, a veces un gran número, de receptáculos dispuestos en una agrupación ordenada. Los documentos EP 1161994 y WO 2004/045772 describen placas multipocillo. Con el fin de no afectar a la reacción, los receptáculos se forman frecuentemente a partir de polipropileno como una agrupación ordenada de pocillos en una placa. Los pocillos se insertan en un bloque metálico que es controlado térmicamente de modo que los pocillos sean controlados térmicamente por conductividad térmica a través de las paredes de los pocillos. Para muchas reacciones, se dispone un elemento de sellado sobre la parte superior del pocillo con el fin de sellar el contenido. Dichos elementos de sellado son generalmente transparentes o translúcidos para permitir que sean detectadas las emisiones procedentes de los pocillos, como se describe anteriormente. Los elementos de sellado pueden ser autoadhesivos o pueden ser sellados térmicamente al borde del pocillo. Sin embargo, la reacción en el pocillo produce frecuentemente vapor que

se evapora y, a continuación, puede condensarse sobre la superficie interior del elemento de sellado, produciendo así gotitas en la superficie interior del elemento de sellado que provocan que se reduzca la detección de emisiones. Con el fin de calentar el elemento de sellado y evitar la condensación sobre la superficie inferior de la misma, se posiciona frecuentemente una tapa calentada sobre la superficie superior del elemento de sellado. Además, debido a que la reacción en el pocillo puede producir presión sustancial en el pocillo, especialmente a temperaturas más altas, se hace comúnmente que la tapa calentada proporcione presión sobre la superficie superior del elemento de sellado con la finalidad de intentar detener la expansión y/o explosión de la misma hacia fuera del borde del pocillo. Incluso pequeños fallos en la capa de sellado pueden llevar a la pérdida del contenido del pocillo debido a la evaporación, llevando potencialmente a una contaminación transversal de los pocillos, a cambios en la concentración del pocillo que conducen a alteraciones de las propiedades ópticas y de la PCR y, en el peor caso, a una contaminación del entorno del laboratorio. Una contaminación de este tipo puede ser problemática puesto que los pocillos pueden contener ADN amplificado que puede afectar al trabajo posterior llevado a cabo en el laboratorio.

Sin embargo, los sistemas conocidos anteriores adolecen de diversos inconvenientes que se pondrán de manifiesto en la descripción posterior, y algunos aspectos de la presente invención están destinados a superar, o al menos mitigar, algunos de estos problemas ya sea individualmente o en combinación.

En consecuencia, en la presente invención se proporciona un aparato para una reacción química o bioquímica según la reivindicación 1.

Las formas de realización preferidas de la invención se encuentran en las reivindicaciones dependientes adjuntas.

La parte superior y la parte inferior pueden formarse por moldeo, por ejemplo por sobremoldeo de la parte inferior sobre la parte superior, o viceversa. Alternativamente, las partes superior e inferior pueden formarse por moldeo de dos tiros en cualquier orden. La parte superior puede incluir una patilla para manipular el recipiente de reacción.

La barrera térmica es proporcionada por una parte superior del recipiente de reacción. Adicionalmente, la barrera térmica puede estar formada por el elemento de sellado. El elemento de sellado puede ser autoadhesivo para hacer contacto con el borde de la parte superior del recipiente de reacción. Alternativamente, el elemento de sellado puede sellarse térmicamente al borde de la parte superior del recipiente de reacción. El elemento de sellado puede estar formado de material de poliéster.

Una barrera térmica puede estar localizada entre el elemento de sellado y la tapa calentada. Esta barrera térmica puede comprender una capa conforme relativamente aislante del calor que puede formarse de un material de silicona ópticamente transparente que deberá ser térmicamente resistente a las temperaturas utilizadas.

El elemento de sellado puede ser autoadhesivo para hacer contacto con el borde de la parte superior del recipiente de reacción. Alternativamente, el elemento de sellado puede ser sellado térmicamente al borde de la parte superior del recipiente de reacción. El elemento de sellado puede formarse de material de poliéster. De nuevo, la capa conforme puede formarse de un material de silicona ópticamente transparente que deberá ser térmicamente resistente a las temperaturas utilizadas.

La parte inferior del recipiente de reacción se forma de un polímero relativamente conductor del calor que puede ser polipropileno con un material de relleno térmicamente conductor.

El aparato puede comprender, en una forma de realización, una agrupación ordenada del tipo anteriormente, estando posicionada la agrupación ordenada en un montaje térmico, estando el montaje térmico en contacto térmico con al menos la parte inferior de los recipientes de reacción y siendo controlado el montaje térmico para proporcionar un control térmico del interior del recipiente de reacción.

El montaje térmico puede estar provisto de una pluralidad de surcos paralelos en los que están posicionadas las hileras paralelas de los recipientes de reacción. En una forma de realización, cuando las partes inferiores de los recipientes de reacción están provistas de paredes laterales sustancialmente planas, los surcos tienen lados sustancialmente planos para hacer contacto con las paredes laterales de los recipientes de reacción.

El montaje térmico puede comprender una o más secciones huecas entre surcos paralelos adyacentes. Además, el montaje térmico puede incluir un tubo de calor dispuesto en al menos una de las secciones huecas. El montaje térmico puede incluir al menos un sensor de temperatura montado en al menos una de las secciones huecas.

El montaje térmico puede incluir un material aislante dispuesto dentro de al menos una de las secciones huecas. El montaje térmico puede dividirse en dos o más partes térmicamente controladas por separado, teniendo cada parte uno o más surcos para controlar térmicamente de forma independiente los recipientes de reacción posicionados en esos surcos.

En una forma de realización preferida, un sistema detector óptico comprende un dispositivo de detección óptico, pero no incluye un sistema óptico para alterar sustancialmente el ángulo de la línea de visión entre el dispositivo de

detección óptico y las partes más inferiores de los recipientes de reacción más exteriores en la agrupación ordenada. El sistema puede incluir además un aparato como se describe anteriormente.

5 La reacción puede ser una Reacción en Cadena de la Polimerasa u otros tipos de reacciones químicas, tales como, por ejemplo, Reacción en Cadena de la Ligasa, Amplificación Basada en Secuencias de Ácidos Nucleicos, Amplificación de Círculo Rodante, Amplificación por Desplazamiento de Hélice, Amplificación Dependiente de la Helicasa o Amplificación Mediada por Transcripción.

10 Una forma de realización de un sistema que incorpora diversos aspectos de la invención se describirá a continuación más completamente a título de ejemplo haciendo referencia a los dibujos, en los cuales:

La figura 1 muestra un diagrama esquemático de un sistema de PCR convencional;

15 La figura 2 muestra una vista en sección transversal a través de un recipiente de reacción según un primer aspecto de la invención utilizado en el sistema de la figura 1;

La figura 3 muestra una vista en sección transversal extrema a través de una agrupación ordenada de recipientes de reacción del tipo mostrado en la figura 2;

20 La figura 4 muestra una vista en sección transversal lateral a través de una agrupación ordenada de recipientes de reacción del tipo mostrado en la figura 2;

La figura 5 muestra una vista en sección transversal más detallada de un montaje térmico en el que puede posicionarse la agrupación ordenada de las figuras 3 y 4;

25 La figura 6 muestra una vista en sección transversal a través de parte de un sistema de PCR según una forma de realización de la invención, que muestra un recipiente de reacción del tipo mostrado en las figuras 2, 3 o 4 en uso, posicionado en un montaje térmico del tipo mostrado en la figura 5, junto con un elemento de sellado y una tapa calentada;

30 La figura 7 muestra una vista similar a la de la figura 6, pero con una capa conforme térmicamente aislante posicionada entre la tapa calentada y el elemento de sellado; y

35 La figura 8 muestra el sistema de PCR de la figura 6 con un sistema detector óptico posicionado encima de la agrupación ordenada de recipientes de reacción.

40 Así, como se muestra en la figura 1, un sistema de PCR convencional 1 incluye una agrupación ordenada 2 de recipientes 3. La agrupación ordenada 2 está posicionada en un montaje térmico 4 dispuesto sobre un calentador/enfriador 5, tal como un módulo Peltier, del tipo bien conocido. Como es sabido, un módulo Peltier puede utilizarse para calentar o enfriar y el módulo Peltier está posicionado sobre un disipador de calor 6 para proporcionar almacenamiento de energía térmica según se requiera. El disipador de calor 6 está provisto de un ventilador 7 montado sobre un montaje de ventilador 8 en el lado inferior del disipador de calor 6 con el fin de facilitar la disipación del calor según sea necesario.

45 El montaje térmico 4 está realizado en un material con buena conductividad térmica, usualmente metal tal como cobre, y está provisto de depresiones en las que encajan los recipientes 3 de modo que pueda controlarse la temperatura en los recipientes 3 controlando la temperatura del montaje térmico 4. Los recipientes están realizados convencionalmente en polipropileno. Cada recipiente 3 de la agrupación ordenada 2 está configurado en la forma general de un cono y tiene un borde superior 9 que define un perímetro de una abertura 11 que proporciona acceso al recipiente 3. La agrupación ordenada 2 está cubierta por una película relativamente delgada 10 que se sella a los bordes superiores 9 de los recipientes 3 para mantener los reactivos y los productos de reacción dentro de cada recipiente 3. Debido a que pueden producirse presiones sustanciales durante el transcurso de las reacciones en los recipientes 3, la película 10 está amortiguada entre los bordes 9 de los recipientes 3 y un miembro de sujeción superior 12 para reducir las probabilidades de que la película 10 se separe de los bordes 9 a presiones más altas y permita que los reactivos y/o los productos de reacción escapen y/o se mezclen. Con el fin de permitir que se examinen los interiores de los recipientes durante el transcurso de las reacciones que tienen lugar, la película 10 se hace de un material transparente o translúcido y el miembro de sujeción 12 está provisto de aberturas 13 en coincidencia con las aberturas 11 de los recipientes 3 para proporcionar acceso visual a los interiores de cada uno de los recipientes.

60 Sin embargo, como se mencionó anteriormente, el sistema de PCR convencional 1 tiene una serie de desventajas que se harán evidentes. En primer lugar, como ya se ha mencionado, las reacciones en los recipientes 3 pueden producir perfectamente vapor que se evapora y a continuación puede condensarse sobre la superficie interior de la película 10, produciendo así gotitas sobre la superficie interior de la película, lo que puede hacer que se reduzca la visibilidad del interior de los recipientes 3. Con el fin de calentar la película 10 y evitar la condensación sobre la superficie inferior de la misma, una tapa calentada se posiciona frecuentemente sobre la superficie superior de la

película 10. La tapa calentada se forma usualmente de vidrio con un elemento de calentamiento posicionado sobre una superficie de la misma o incrustado dentro de la tapa, y la tapa se hace suficientemente pesada para que proporcione la fuerza de sujeción necesaria para intentar detener su expansión y/o explosión hacia fuera de los bordes de las aberturas 11 de los recipientes 3.

5 Puesto que el polipropileno es térmicamente aislante, lleva generalmente algo de tiempo el que el calor procedente del montaje térmico pase hasta el interior de los recipientes y es difícil controlar con precisión la temperatura dentro de los recipientes y cambiarla rápidamente. Se ha sugerido la producción de tales recipientes a partir de un material térmicamente conductor. Sin embargo, puesto que la tapa calentada está sujetando la película delgada a los bordes superiores de los recipientes, una cantidad sustancial de energía térmica se conduciría entonces hacia fuera de la tapa calentada por el material térmicamente conductor que forma los recipientes 3. Además de la pérdida de energía térmica, esto afectaría también a la temperatura en los recipientes de una manera no controlada y, por tanto, afectaría adversamente al control preciso de la temperatura en los recipientes.

15 En consecuencia, como se muestra en la figura 2, en una realización un recipiente de reacción 20 para una reacción química o bioquímica tiene una parte de receptáculo inferior 21 hecha de un material relativamente conductor del calor y una parte superior 22 hecha de un material relativamente aislante del calor. La película de sellado 23 se muestra también en la figura 2 en aras de una exposición completa.

20 El recipiente 20 se produce como parte de una agrupación ordenada 24 mostrada con más detalle en la figura 3 y 4, producida a base de una parte superior 25 y una parte inferior 21 moldeadas a partir de dos polímeros diferentes. La agrupación ordenada 24 está formada como una serie de hileras en forma de prismas generalmente triangulares de recipientes 20, conteniendo cada hilera una serie de recipientes piramidales truncados 20 de base cuadrada que son depresiones en los prismas triangulares, los cuales son por lo demás macizos. Los lados angulados de los prismas son las superficies de contacto para el montaje térmico 33, que tiene surcos generalmente triangulares 34 que discurren a lo largo de ella, como se muestra en la figura 5, para que los recipientes 20 se asienten en ellos. Como puede verse por las figuras, las secciones transversales no son estrictamente triangulares sino truncadas, en donde las partes inferiores de las hileras de recipientes están truncadas para configurar una forma trapezoidal.

30 La parte superior 25 de la agrupación ordenada 24, que proporciona la parte superior 22 de cada recipiente 20, está hecha de un polímero térmicamente aislante (TI) (también de baja capacidad térmica), tal como polipropileno. La parte superior 25 proporciona el borde superior 26 de cada recipiente 20, al que puede aplicarse la película de sellado 27, y define aberturas cuadradas para permitir el acceso a los recipientes 20. La película de sellado 27 puede ser autoadhesiva o puede sellarse térmicamente a los bordes superiores 26. Como se explicará más completamente a continuación, se utiliza una tapa calentada para aplicar presión a este borde superior 26 a través de la película de sellado 27 mientras el elemento desechable esté en uso. Este borde superior 26 forma así, esencialmente, una rejilla bidimensional con agujeros cuadrados. Como se muestra en la figura 4, la parte superior 25 está provista también de una patilla para manipular la agrupación ordenada 24 sin tocar los recipientes 20. La patilla 28, al ser de material térmicamente aislante, puede manipularse sin peligro de estar demasiado caliente y es también suficientemente grande para llevar un logo, texto y/o un código de barras 2D para seguimiento (éste puede leerse desde arriba por el mismo sistema óptico utilizado para mediciones de fluorescencia). La patilla 28 proporciona también una característica de alineamiento con el fin de impedir la inserción de la agrupación ordenada con una orientación errónea en el montaje térmico, puesto que, de otra manera, sería posible insertarla girada en 180 grados, lo cual trabajaría físicamente, pero produciría resultados confusos. La parte superior 25 está provista también de divisores 29 que sobresalen hacia abajo desde los bordes superiores 26 entre cada par de recipientes 20 en una hilera y al final de las hileras. Estos divisores 29 forman un volumen de masa térmica baja entre las paredes de los recipientes. En algunas realizaciones, la parte superior 25 podría estar provista también de un faldón alrededor de la agrupación ordenada para permitir que ésta se apile con otras agrupaciones ordenadas y para la manipulación automatizada. Tal faldón puede ser hecho de modo que cumpla con diversos estándares de la industria, tales como la especificación MTP. Tal faldón puede sustituir a la patilla 28.

La parte inferior 21 está realizada en un polímero térmicamente conductor (TC), tal como polipropileno con un material de relleno térmicamente conductor (por ejemplo, nitruro basado en carbono o nitruro de boro) y está moldeada sobre la parte superior 25. La parte inferior 26 proporciona una serie de "cáscaras" piramidales truncadas invertidas que forman el depósito real de cada recipiente 20, cuya superficie interior contiene el volumen de reactivo, y dos lados 30, 31 de la superficie exterior hacen contacto con el montaje térmico. La "base" de la pirámide proporciona los huecos abiertos para permitir el llenado y el acceso óptico al interior de los recipientes. La parte inferior 21 proporciona también planos de unión entre cada cáscara piramidal para producir una forma de prisma aproximadamente triangular (realmente un prisma trapezoidal).

60 Las ventajas de tener dos partes diferentes de dos polímeros diferentes, uno térmicamente conductor y uno térmicamente aislante, es que el polímero térmicamente conductor puede utilizarse sólo cuando sea necesario conducir calor rápidamente hacia dentro y hacia fuera del recipiente y entre los recipientes por razones de uniformidad. Otras regiones pueden realizarse a partir de polímero térmicamente aislante, reduciendo la pérdida de energía térmica de la agrupación ordenada hacia el entorno que pueda ralentizar el calentamiento y producir gradientes de temperatura indeseables. En particular, la región en contacto con la tapa calentada puede hacerse

térmicamente aislante, reduciendo así en gran parte la influencia no deseada de la temperatura de la tapa calentada sobre la temperatura del volumen de reacción mientras se impide todavía la condensación. La capacidad térmica de la agrupación ordenada puede reducirse también, puesto que el polímero térmicamente aislante tiene una capacidad de calentamiento específica menor que la del polímero térmicamente conductor, de modo que necesita añadirse o retirarse de la agrupación ordenada menos energía térmica para alterar la temperatura.

Los recipientes 20 piramidales truncados tienen un fondo plano 32 con una anchura/altura mayores que un tamaño de pipeta estándar. Una pipeta insertada con la mayor parte de su extensión en el recipiente se alineará así automáticamente con este fondo plano y, por tanto, el recipiente se llenará fácilmente. En esta posición, la pipeta recubrirá también la mayoría de la muestra. Las paredes inclinadas del recipiente disuaden también de una formación de perlas de la muestra, que puede ocurrir en recipientes con paredes verticales.

Cada una de las partes superior e inferior puede moldearse utilizando tecnología de moldeo por inyección estándar. La parte térmicamente aislante es producida primero y, a continuación, insertada en un segundo moldeo en el que el polímero térmicamente conductor es sobremoldeado para añadir la segunda parte y completar la agrupación ordenada. Alternativamente, la parte térmicamente conductora podría hacerse primero y sobremoldearse a continuación con la parte térmicamente aislante. Podrían utilizarse alternativamente otros procesos de moldeo, por ejemplo un procedimiento de moldeo de dos tiros. Por tanto, será evidente que, en la forma de realización preferida, sólo está presente polímero térmicamente conductor a lo largo de la trayectoria de calentamiento desde el montaje térmico 33 hasta el volumen de reactivo, aumentando las prestaciones térmicas. Por tanto, será evidente que el material térmicamente conductor no necesita ser un polímero, sino que podría ser otro material térmicamente conductor tal como, por ejemplo, chapa metálica.

Será evidente también que cada recipiente 20 de la agrupación ordenada 24 puede tener un par de caras planas exteriores opuestas 30, 31 para hacer contacto con el montaje térmico. Estas caras exteriores 30, 31 son sustancialmente planas y configuran una forma estrechada hacia abajo, permitiendo un buen contacto con el montaje térmico cuando la agrupación ordenada 24 se posiciona en ella. Las paredes laterales sustancialmente planas están dispuestas generalmente en paralelo con respecto a un eje transversal del recipiente de reacción, teniendo al menos la parte inferior del recipiente de reacción una sección transversal constante a lo largo del eje transversal. Cada recipiente tiene también un par de paredes extremas opuestas entre las paredes laterales, cuyas paredes extremas son también planas, definiendo así la configuración piramidal truncada inversa que culmina en un vértice aplanado más inferior, y las paredes laterales y extremas tienen una configuración similar a un prisma truncado que culmina en un surco aplanado que se extiende en paralelo al eje transversal.

En general, la agrupación ordenada 24 tendrá una pluralidad de hileras de recipientes de reacción, extendiéndose cada hilera en paralelo al eje transversal. La alineación de los recipientes de reacción en el montaje térmico es así autocorrectora, ya que la presión asentará la agrupación ordenada en una posición más baja dentro del montaje térmico hasta que la agrupación ordenada esté alineada y en buen contacto conforme. Se permitirá por esta geometría cualquier expansión de los recipientes durante el calentamiento. Los formatos estándar, tal como la Placa de Microvaloración, pueden utilizarse para el espaciado y otras dimensiones de los recipientes de reacción, ya que estos son adecuados para el apilamiento y la manipulación robótica y son bastante robustos, etc. Sin embargo, esto no es siempre posible para todos los formatos.

La figura 5 muestra una forma de realización de un montaje térmico 33 que proporciona en él una fácil alineación de la agrupación ordenada de recipientes, particularmente en comparación con los recipientes convencionales descritos anteriormente. Será obvio que con las agrupaciones ordenadas convencionales de recipientes sustancialmente cónicos, la agrupación ordenada podría encajarse en el montaje térmico en cualquiera de cuatro configuraciones laterales. Sin embargo, la agrupación ordenada y el montaje presentes permiten sólo dos configuraciones laterales debido a la manera en que las hileras de recipientes de la agrupación ordenada deben encajar en un surco 34 del montaje térmico 33. Como puede verse, los surcos 34 se definen por pares de paredes longitudinales 35, 36 que se extienden hacia arriba desde una base 37 en ángulos divergentes, teniendo el surco un fondo plano 38 correspondiente al fondo plano 32 de los recipientes 20. Obviamente, el ángulo divergente de las paredes longitudinales 35, 36 coincide sustancialmente con el ángulo de estrechamiento entre las paredes laterales 30, 31 de los recipientes, de modo que se hace buen contacto entre los recipientes y el montaje térmico.

El montaje térmico 33 puede estar realizado en una forma extruida que tiene una sección transversal constante a lo largo de su longitud. Esto permite una fabricación por corte con cable para alta precisión, o por extrusión para una precisión razonablemente buena y un coste mucho más bajo. La masa del montaje térmico puede reducirse sustancialmente, en comparación con los montajes térmicos macizos convencionales, eliminando el material que no esté en contacto inmediato con los recipientes de la agrupación ordenada. Como puede verse, esto sería mucho más difícil (y la fabricación general es también más difícil) para un montaje térmico macizo que requiera una agrupación ordenada de depresiones para recipientes no formados como hileras. La masa reducida es también un factor importante al incrementarse la tasa a la que el propio montaje se calienta y se enfría, lo cual puede ser un factor limitante en las tasas de calentamiento/enfriamiento del volumen de reactivo final.

Los elementos de masa térmica baja, térmicamente aislantes, entre los recipientes reducen la capacidad térmica de

la agrupación ordenada para la realización de ciclos más rápidos y aísla también las paredes de los recipientes que no están en contacto con el montaje térmico. Esto permite que las paredes térmicamente conductoras de los recipientes se equilibren rápidamente y ayuden al volumen de reactivo a equilibrarse. Las paredes térmicamente conductoras de los recipientes están conectadas una con otra en hileras contiguas, de modo que sólo se requiere una trayectoria para llenar cada hilera durante el moldeo por inyección. Por el contrario, si cada recipiente tuviera un volumen aislado térmicamente conductor, cada recipiente necesitaría una trayectoria de flujo independiente para moldeo, incrementando en gran medida el coste y la complejidad.

Para aplicaciones en las que es importante un gran volumen de reacción, es posible unir entre sí dos o más recipientes adyacentes en una hilera para formar un recipiente más largo con mucha mayor capacidad de volumen. Incluso con tales recipientes de volúmenes mayores, puede usarse el mismo montaje térmico, puesto que la geometría puede acomodar múltiples agrupaciones ordenadas diferentes con distintos volúmenes de recipiente. Obviamente, el uso del mismo montaje térmico significa que puede utilizarse también el resto del aparato.

Haciendo referencia de nuevo a la figura 6, se muestra un aparato 40 en el que una agrupación ordenada 41 de recipientes de reacción 42, que es preferiblemente similar a la descrita anteriormente con referencia a las figuras 3 y 4, está montada en un montaje térmico 43 que es preferiblemente similar al descrito anteriormente con referencia a la figura 5. El resto del aparato es esencialmente similar al descrito anteriormente con referencia a la figura 1. Así, el montaje térmico 43 está posicionado sobre un calentador/enfriador 45, tal como un módulo Peltier, del tipo bien conocido. Como es sabido, un módulo Peltier puede utilizarse para calentar o enfriar y el módulo Peltier está posicionado sobre un disipador de calor 46 con el fin de proporcionar almacenamiento de energía térmica según se requiera. El disipador de calor 46 está provisto de un ventilador 47 montado sobre un montaje de ventilador 48 en el lado inferior del disipador de calor 46 con el fin de facilitar la disipación del calor, según sea necesario.

La agrupación ordenada 41 está cubierta por una película relativamente delgada 44 que se sella a los bordes superiores 49 de los recipientes 42 para mantener los reactivos y los productos de reacción dentro de cada recipiente 42. Debido a que pueden producirse presiones sustanciales durante el transcurso de las reacciones en los recipientes 42, la película 44 se sujeta entre los bordes superiores 49 de los recipientes 42 y una tapa calentada 50 para reducir las posibilidades de que la película 44 se separe de los bordes superiores 49 a presiones más altas y permita que los reactivos y/o los productos de reacción escapen y/o se mezclen. Con el fin de permitir que los interiores de los recipientes se examinen durante el transcurso de las reacciones que tienen lugar, la película 44 se hace de un material transparente o translúcido y la tapa calentada 50 se hace también de un material transparente o translúcido, por ejemplo vidrio, para proporcionar acceso visual a los interiores de cada uno de los recipientes 42.

Se verá que los recipientes 42 se colocan en el montaje térmico 43 que hace contacto con la superficie exterior de los recipientes, proporcionando calentamiento al recipiente por conducción. Por conveniencia, el término "montaje" se utilizará como un término general para el elemento en el que se sujeta el recipiente para el control térmico. Sin embargo, deberá ser obvio que son posibles muchas geometrías diferentes incluso con la misma forma de recipiente. En cicladores térmicos convencionales, el soporte es un bloque metálico macizo con un elemento de control térmico similar a un módulo Peltier en el lado inferior, y la agrupación ordenada de recipientes se coloca en pocillos mecanizados en la superficie superior del bloque metálico. Alternativamente, un ciclador térmico podría tener elementos de control térmico menores en contacto directo con los recipientes desechables. En algunos ejemplos, el montaje es un fluido tal como, por ejemplo, un líquido o un gas.

Hay generalmente uno o más sensores de temperatura en contacto con alguna parte del montaje térmico o la agrupación ordenada de recipientes de reacción, utilizados como realimentación para el control de la temperatura.

El montaje térmico contendrá alguna forma de controlador de temperatura, comúnmente un calentador resistivo (por ejemplo, alambre de nicromo, nicromo químicamente grabado, etc.) o una bomba de calor, normalmente un elemento Peltier. Éste se controla para conseguir el perfil de temperatura requerido.

Después de llenar los recipientes de reacción con reactivos, los recipientes deben sellarse para contener los reactivos durante la PCR u otros procedimientos de amplificación de ácido nucleico. La contención efectiva es crítica, puesto que la contaminación cruzada durante las reacciones es un reto técnico persistente cuando el ADN presente en los recipientes se amplifica en un gran factor, y si incluso una pequeña cantidad de este ADN amplificado sale de un recipiente y contamina otras reacciones, dicha cantidad puede amplificarse a continuación en reacciones posteriores o en recipientes próximos, proporcionando falsos resultados positivos.

Para PCR en tiempo real, los reactivos en los recipientes desechables son vigilados ópticamente. Se excitan tintes fluorescentes con uno o más espectros de luz y se detecta el espectro de luz emitido. Un ejemplo común sería utilizar luz azul para excitar el tinte SYBR verde I, midiendo la luz verde devuelta para detectar la cantidad de ADN de doble hélice presente. Los recipientes necesitan proporcionar una ventana ópticamente transparente y no fluorescente para que entre la luz de excitación y para la luz emitida salga del recipiente. El análisis de la cinética con la que se amplifican los ácidos nucleicos permite la estimación de la cantidad de partida de ácido nucleico objetivo en el volumen de reacción.

5 Durante la ciclización térmica, los componentes volátiles de la mezcla de reacción (por ejemplo, agua) tienden a evaporarse. Esto cambia la concentración de la solución de reactivo (lo que se traduce potencialmente en cambios de la eficiencia del proceso de amplificación), produce pérdida de calor desde el volumen de reacción (dando un control de temperatura impredecible) y puede provocar condensación en las superficies interiores del recipiente, incluyendo la ventana óptica. El último problema reduce la cantidad de luz de excitación que entra y de luz emitida que deja el recipiente, afectando a las mediciones ópticas e introduciendo así ruido en la señal óptica medida. Para evitar esto, se dispone la tapa calentada, que calienta las ventanas ópticas de los recipientes, reduciendo la condensación. Esto se combina frecuentemente con una segunda función de aplicar presión hacia abajo al recipiente. Esto se utiliza tanto para proporcionar contacto térmico mejorado entre el recipiente y el montaje como para ayudar también a mantener un sellado efectivo de los recipientes de reacción.

15 No obstante, en algunos casos, las partes superiores de los bordes superiores de los recipientes de reacción en la agrupación ordenada pueden no estar precisamente en el mismo plano. Puesto que la tapa calentada es usualmente bastante plana y rígida, cualquier imperfección en la coplanaridad de los bordes superiores de los recipientes de reacción de la agrupación ordenada puede dar como resultado que la tapa calentada no proporcione la presión hacia abajo en el elemento de sellado todo alrededor de cada uno de los recipientes, con el resultado de que, en algunos casos, el elemento de sellado puede levantarse de un borde y permitir que escapen materiales. Así, con el fin de intentar mitigar esta posibilidad, el aparato puede incluir una capa conforme en el lado inferior de la tapa calentada, entre la tapa y el elemento de sellado. Esto se muestra mejor en la figura 7, en la que los mismos elementos que en el aparato de la figura 6 se muestran con los mismos números de referencia y no se describirán con detalle de nuevo. Así, como se muestra en la figura 7, una capa conforme 51 está dispuesta entre la tapa calentada 50 y el elemento de sellado 44. La capa conforme 44 puede estar realizada a partir de cualquier material adecuado, pero será evidente que deberá ser ópticamente transparente o translúcida para permitir el acceso óptico desde arriba de la tapa calentada y hacia dentro de los recipientes de reacción, y deberá ser relativamente blanda o esponjosa para permitir que se adapte a la forma y a cualquier imperfección de los bordes superiores de los recipientes de reacción.

30 En la figura 8 se muestra un sistema de PCR en el que, de nuevo, los mismos elementos que en el aparato de la figura 6 se identifican con los mismos números de referencia y no se describirán con detalle otra vez. Sin embargo, en este sistema se proporciona un sistema de detección óptico 52 dispuesto encima de la tapa calentada 50. Después de la preparación y carga, los recipientes se someten a un perfil térmico controlado. El objetivo ideal es tomar una masa de líquido en un recipiente y, en cualquier punto dado del tiempo, conseguir una temperatura uniforme exacta en toda la masa de líquido. La propia reacción PCR es inducida por cambios de temperatura, y las propiedades y el comportamiento del ADN, las enzimas y los tintes utilizados para lecturas ópticas son todos ellos fuertemente dependientes de la temperatura. De ahí que cualquier imprecisión en el control de la temperatura afectará ampliamente a la calidad de los resultados o incluso impedirá del todo que ocurra o se mida la reacción. La velocidad de control directo afecta directamente a la tasa a la que puede realizarse la PCR, afectando así al tiempo requerido para un experimento exitoso (las enzimas u otros reactivos utilizados se degradan a temperaturas más altas). Cualquier falta de uniformidad en la temperatura de los reactivos (ya sea dentro de un recipiente individual o entre diferentes recipientes) puede afectar también a la eficiencia de las reacciones de amplificación y, por tanto, a la precisión de las mediciones resultantes. Además, en muchos casos, después de la amplificación de los ácidos nucleicos se determina la naturaleza de los ácidos nucleicos amplificados midiendo su estabilidad térmica. Una vez que la reacción PCR se complete, la temperatura del volumen de reacción aumenta lentamente y tiene lugar un proceso análogo a la fusión alrededor de una cierta temperatura, viniendo dicha temperatura dictada por la naturaleza de los ácidos nucleicos amplificados, con resultados ópticamente detectables. Si la temperatura en un recipiente es uniforme, el ADN se fundirá en todo el recipiente al mismo tiempo produciendo una transición brusca en las propiedades ópticas – si el volumen de reacción tiene diferentes regiones a diferentes temperaturas, éstas se fundirán en diferentes momentos dando un pico menos discretos, comprometiendo potencialmente 1) la cantidad de ácidos nucleicos amplificados que puede analizarse por este procedimiento, 2) el número de diferentes especies de ácidos nucleicos que pueden discriminarse en un único volumen de reacción, y 3) la precisión y exactitud con las que pueden determinarse las “propiedades de fusión” de los ácidos nucleicos. Así, como se muestra también en la figura 7, el montaje térmico está provisto de un sensor de temperatura 53 dispuesto en uno de los canales del montaje térmico entre las paredes longitudinales estrechadas 35, 36. Este sensor se acopla al controlador de temperatura (no mostrado, que controla el módulo Peltier 45). Aunque en algunos casos bastará un único sensor, si la distribución de calor en todo el montaje térmico es uniforme, en otros casos puede disponerse más de un sensor de temperatura a intervalos en un solo canal y en diferentes canales del montaje térmico para asegurar que cada recipiente en toda la agrupación ordenada esté a la misma temperatura, de modo que cada uno se fundirá a la misma temperatura medida.

60 En un sistema en el que el calor se conduce hacia dentro y hacia fuera del volumen de reactivo, este volumen de reactivo debe equilibrarse. Esto tiene lugar cuando la energía térmica es conducida desde la superficie exterior en contacto con los recipientes a través del volumen, principalmente a través de conducción y convección, con el “centro” del volumen quedando detrás. La velocidad de equilibrio se ve afectada por las propiedades del reactivo, lo cual no se ve afectado por la geometría de los recipientes, sino por la forma del recipiente, con mejores prestaciones dadas por un área superficial mayor para calentamiento y un volumen con una distancia máxima baja desde la superficie hasta un punto en el volumen (la distancia más larga que tiene que ser conducido el calor para alcanzar el interior del líquido).

Como se describe anteriormente, la forma de la cavidad proporcionada para el reactivo determina su forma y, por tanto, su equilibrado. Además, el espesor de las paredes del recipiente y el área en contacto con el bloqueo en el exterior y el volumen de reacción en el interior afectan a la resistencia térmica ofrecida por las paredes del recipiente – cuanto menor es ésta, mayor es la tasa de calentamiento y enfriamiento a través de las paredes del recipiente. Por supuesto, la conductividad térmica de las regiones del recipiente a través de las cuales se conduce también calor, influye directamente en la tasa de conducción.

Idealmente, deberá hacerse un contacto conforme completo con el montaje térmico por las superficies exteriores de los recipientes. Esto dará como resultado la menor resistencia térmica entre los sitios de contacto y, por tanto, ayudará a mejorar la uniformidad entre los recipientes. Cuando el contacto se hace sólo en parches o en puntos pequeños, las prestaciones se reducirán y se producirá falta de uniformidad. Aunque el equilibrado puede producirse finalmente, las temperaturas ajustadas pueden no mantenerse suficiente tiempo para que esto ocurra, imponiendo el riesgo de que no se alcancen temperaturas críticas requeridas para una amplificación de ácido nucleico eficiente. Esto puede verse afectado por el material del recipiente, el acabado y la geometría de la superficie y también la geometría del montaje térmico.

Durante el experimento, la reacción se vigilará por el sistema de detección óptico 52. Idealmente, el volumen de reactivo deberá ser accesible ópticamente de manera completa a todas las longitudes de onda desde todos los ángulos. Sin embargo, con el fin de hacerlo así efectivamente, los sistemas de detección que utilizan excitación de luz deben tener una línea clara de acceso al contenido de líquido máximo. Cuando se utiliza un detector de formación de imagen, tal como un sensor CCD o CMOS con un sistema óptico, deberá haber una trayectoria clara en el sistema óptico para la luz emitida que ha de ser recogida por el sensor. Además, los sistemas que miden una agrupación ordenada de puntos en todo el campo de visión deben tener una cobertura óptica (relación de espacio ocupado por ventanas de recipiente al espacio en blanco entre ellas). En consecuencia, como se muestra en la figura 7, las paredes laterales de los recipientes están inclinadas hacia abajo con respecto a la vertical en un ángulo  $\theta$  que es al menos igual a un ángulo máximo  $\phi$  con respecto a la vertical de una línea de visión entre el sistema detector óptico 52 y los recipientes de reacción más exteriores de la agrupación ordenada. Esto permite que las señales ópticas procedentes de una parte más inferior de los recipientes de reacción sean detectadas por el sistema detector óptico 52.

Para cualquier sensor o sensores, dos factores influyen en la eficiencia con la que la luz de excitación alcanza cada reacción y la luz emitida es recogida. La señal óptica devuelta (para un estado de reactivo dado) es aproximadamente el producto de la intensidad de excitación y la eficiencia de recogida de emisión, y así si una u otra varía entre recipientes, éstas no producirán la misma señal en el mismo estado. Esto puede corregirse por procesamiento de señal, pero idealmente la señal original deberá ser uniforme en toda la placa. El efecto principal es que la mayoría de los sensores tienen un rango dinámico limitado y deben ajustarse de modo que el recipiente “más brillante” no los sature. Si el pocillo “más pálido” es mucho menos intenso que el más brillante, no se medirá con la mejor precisión la relación señal a ruido. Cuanto más fuerte es la excitación y mejor es la eficiencia de recogida de luz emitida para un pocillo dado, entonces mejor será la relación señal a ruido y menor será el nivel de tinte (respuesta) que puede detectarse. En general, las longitudes de onda utilizadas son visibles (para excitación y emisión), pero pueden extenderse hacia abajo a UV para excitación e IR para emisión, aunque esto hace que el diseño óptico sea más difícil, puesto que muchos materiales ópticos y de sellado comunes no son transparentes a UV. Una buena transmisión sobre las longitudes de onda visibles es ofrecida por el polipropileno ordinario. Pueden utilizarse polímeros más inusuales para transmisión de UV, pero puede ser más difícil conseguir compatibilidad (física y biológica) con la PCR.

Puesto que la excitación es generalmente mucho más intensa que la emisión fluorescente resultante, es necesario distinguirla de la emisión. En general, esto se hace por filtrado, en donde se elige (o se filtra en paso de banda) la fuente de excitación de modo que tenga un espectro bastante estrecho y esto espectro se bloquea después con un filtro sobre el sensor óptico. Son posibles diferentes variaciones utilizando espejos dicróicos, etc., pero generalmente está implicado el filtrado de alguna forma. Si los recipientes son más reflectantes, entonces la luz de excitación reflejada que pasa a través del volumen de reactivo durante un segundo tiempo puede producir más excitación fluorescente, y puesto que la emisión de fluorescente es omnidireccional, un recipiente reflectante puede emitir luz que de otra forma faltaría en el retorno al sensor óptico. Así, puede ser deseable en algunos casos hacer más reflectante el material del cual está formado el recipiente, por ejemplo añadiendo un material reflectante al polímero que forma la parte inferior de los recipientes. La minimización de la fluorescencia intrínseca de los materiales del recipiente es también importante, ya que ésta puede interferir con la medición de la fluorescencia de reacción real.

Para algunas aplicaciones, las mediciones realizadas en el propio aparato (mediciones de temperatura y ópticas) son suficientes para el análisis y las propias muestras no son de uso adicional. Sin embargo, para otras aplicaciones, las muestras pueden ser analizadas adicionalmente en la agrupación ordenada de recipientes o, más frecuentemente, después de recuperarse de los recipientes. Por esta razón, deberá ser posible eliminar la película de sellado sin perturbar el contenido (el contenido no deberá sujetarse contra la película de sellado a la que puede adherirse, y deberá ser permitida la fuerza requerida para retirar el elemento de sellado sin expulsar el contenido). Deberá ser posible también recuperar la muestra de los recipientes, utilizando generalmente una pipeta, con una

eficiencia razonable. Idealmente, no deberá haber áreas del recipiente en las que el líquido sea inaccesible, etc.

5 Será evidente por la descripción anterior que la agrupación ordenada de recipientes de reacción proporciona las ventajas de que pueden almacenarse fácilmente antes del uso, rastrearse y manipularse posiblemente por sistemas automatizados. Además, los recipientes de reacción están conformados de modo que sea posible llenar el recipiente sin la formación de burbujas en ausencia de requisitos estrictos para posicionar la punta de la pipeta o para el caudal de líquido. El líquido no “forma perlas” en el recipiente, sino que forma una nítida capa en el fondo del recipiente. Esto permite un sellado más fácil, puesto que el líquido no entrará en contacto con la película de sellado (si ésta se utiliza).

10 Los recipientes de la agrupación ordenada pueden llenarse en etapas, con movimiento y/o enfriamiento brusco (para preservar ADN/enzimas, etc.) entre etapas. Esto es fácil de hacer a mano o en un sistema automatizado. Los recipientes son también fáciles de sellar con un elemento de sellado fiable que se forma entre los recipientes y el entorno, así como entre los recipientes (particularmente recipientes próximos). Este elemento de sellado es efectivo por sí solo a temperatura ambiente y efectivo a presiones más altas (con la ayuda de una tapa calentada u otros elementos del sistema) durante el ciclado térmico. Métodos de sellado alternativos comunes, además de una película pegada al desechable por adhesivo o calor, son tapas empujadas hacia dentro de los recipientes. Los recipientes son también fáciles de cargar en el aparato a mano o mediante procesos automatizados, con una alineación correcta obvia que puede imponerse por medio de marcadores, geometría de los recipientes etc. Será difícil dañar la agrupación ordenada de recipientes o el aparato por carga incorrecta, a menos que esta carga incorrecta sea fácilmente evidente para el usuario.

## REIVINDICACIONES

1. Aparato para una reacción química o bioquímica, comprendiendo el aparato al menos un recipiente de reacción (20) que presenta una parte de receptáculo inferior (21) de un polímero térmicamente conductor para recibir, durante el uso del recipiente de reacción (20), unos reactivos químicos y/o bioquímicos, y una parte superior (22) que presenta un borde (26) que define una abertura que permite el acceso a la parte inferior (21), un elemento de sellado (27) que tiene una superficie interna y externa para cubrir el borde (26) cuando los reactivos se han cargado en la parte de receptáculo (21), y una tapa calentada (50) que debe ser aplicada sobre la superficie externa del elemento de sellado (27) para calentar el elemento de sellado (27) y reducir de este modo la condensación en la superficie interna del elemento de sellado (27), caracterizado porque la parte superior (22) del recipiente de reacción (20) es de un polímero térmicamente aislante y proporciona una barrera térmica entre la parte inferior (21) del recipiente de reacción (20) y la tapa calentada (50).
2. Aparato según la reivindicación 1, en el que el polímero térmicamente conductor comprende polipropileno con un material de relleno térmicamente conductor.
3. Aparato según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que el polímero térmicamente aislante comprende polipropileno.
4. Aparato según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la parte superior y la parte inferior están formadas por moldeo, por ejemplo por sobremoldeo de una parte sobre otra.
5. Aparato según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la parte inferior (21) del recipiente de reacción (20) presenta al menos un par de paredes laterales (30, 31) opuestas sustancialmente planas paralelas a un eje transversal del recipiente de reacción (20) para contactar térmicamente con un montaje térmico (33) para controlar térmicamente el interior del recipiente de reacción (20).
6. Aparato según la reivindicación 5, que presenta una agrupación ordenada (24) de recipientes de reacción (20), presentando la agrupación ordenada (24) una pluralidad de hileras de recipientes de reacción (20), extendiéndose cada hilera en paralelo al eje transversal.
7. Aparato según la reivindicación 6, en el que las hileras de los recipientes de reacción (20) están unidas a lo largo del eje transversal para formar unas hileras que tienen una sección transversal sustancialmente constante.
8. Aparato según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 a 5, que presenta una agrupación ordenada (24) de recipientes de reacción (20).
9. Aparato según la reivindicación 8, en el que la agrupación ordenada (24) presenta una pluralidad de hileras paralelas de recipientes de reacción.
10. Aparato según la reivindicación 9, en el que al menos las partes inferiores (21) de al menos algunos de los recipientes de reacción (20) tienen una forma cónica invertida.
11. Aparato según la reivindicación 9 o la reivindicación 10, en el que las partes superiores (22) de los recipientes de reacción (20) son moldeadas conjuntamente para conectar los recipientes de reacción con el fin de formar la agrupación ordenada.
12. Aparato según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la tapa calentada es controlada (50) para producir suficiente calor y presión sobre el elemento de sellado (27) con el fin de sellar térmicamente el elemento de sellado (27) al borde (26) del recipiente de reacción (20).
13. Aparato según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el aparato comprende una agrupación ordenada (24) de recipientes de reacción (20), estando posicionada la agrupación ordenada (24) en un montaje térmico (33), estando el montaje térmico (33) en contacto térmico con al menos la parte inferior (21) de los recipientes de reacción (20) y siendo controlado el montaje térmico (33) para proporcionar un control térmico del interior del recipiente de reacción (20).
14. Aparato según la reivindicación 13, en el que el montaje térmico (33) está provisto de una pluralidad de surcos paralelos (34) dentro de los cuales están posicionadas las hileras paralelas de recipientes de reacción (20).

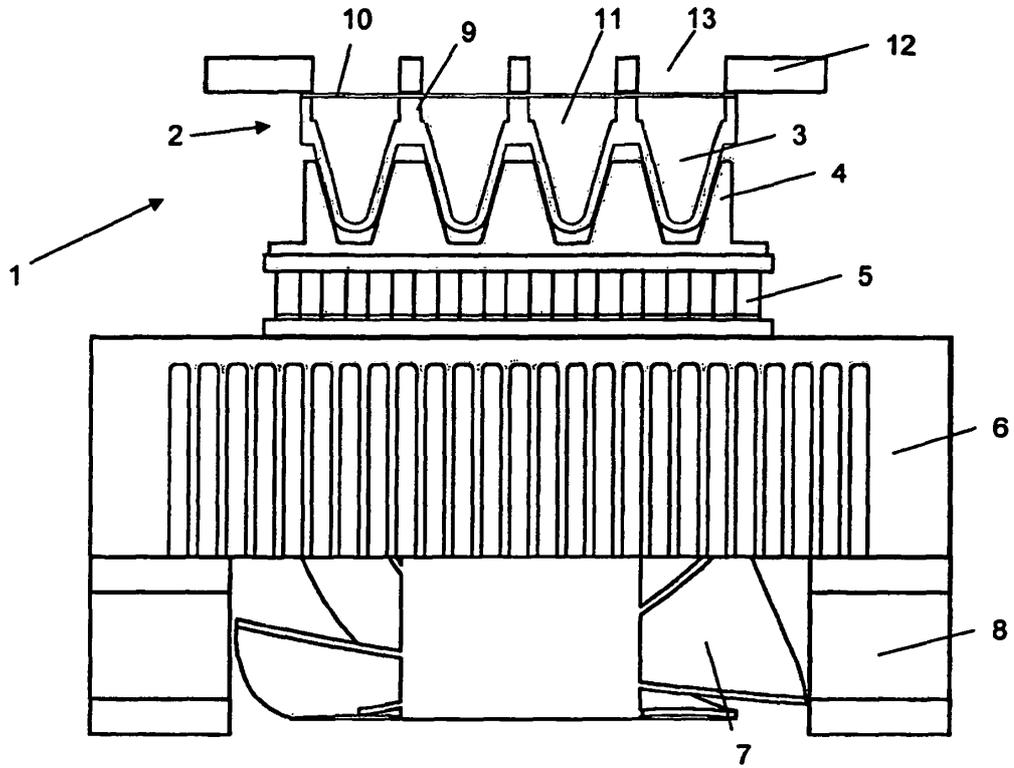


Figura 1

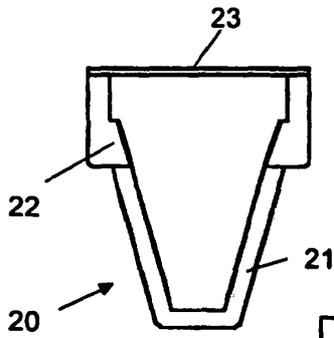


Figura 2

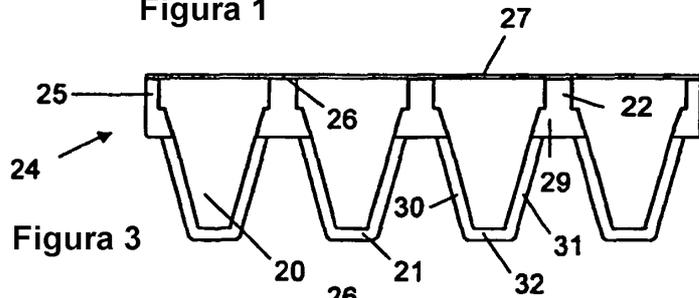


Figura 3

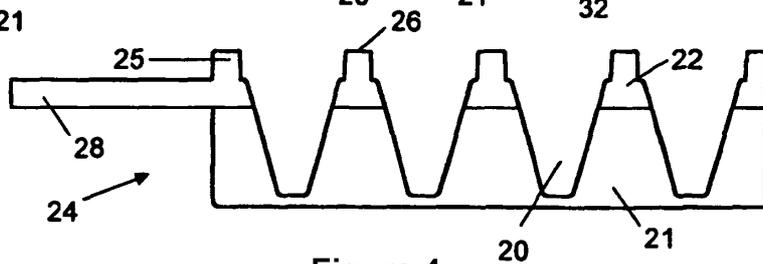


Figura 4

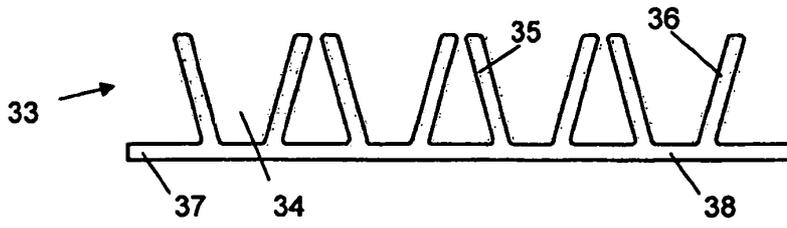


Figura 5

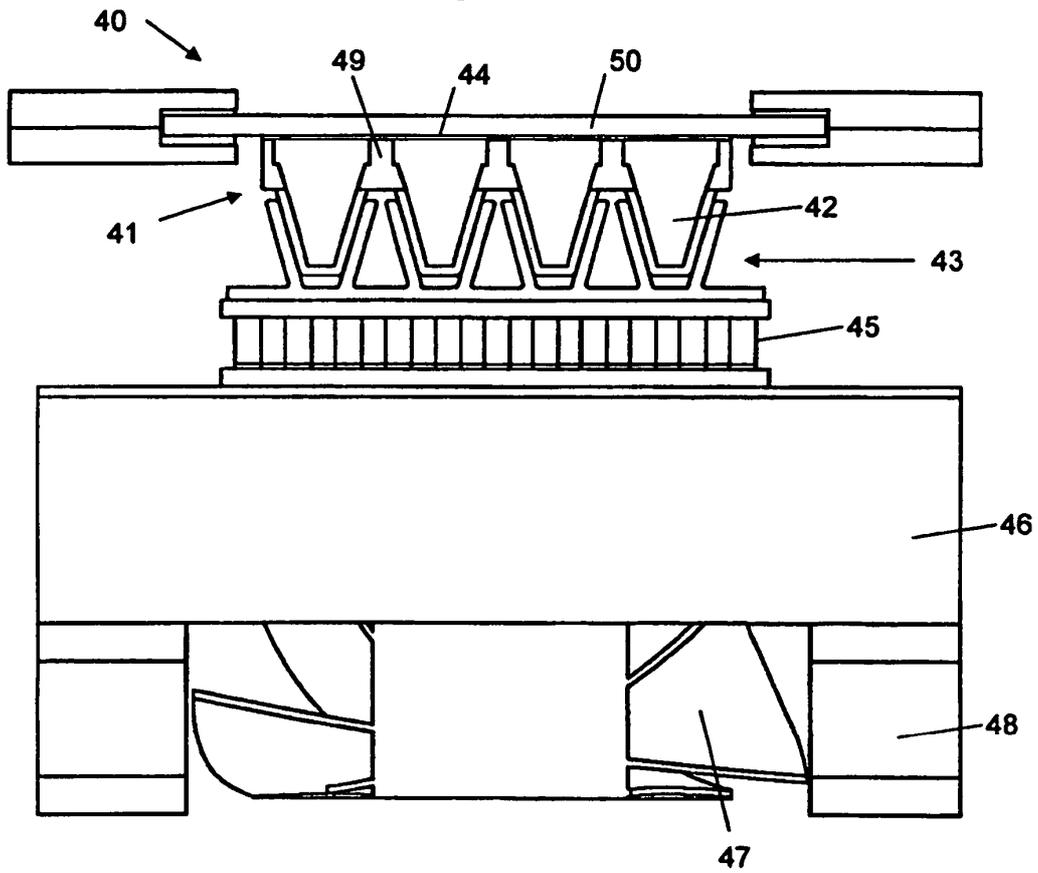


Figura 6

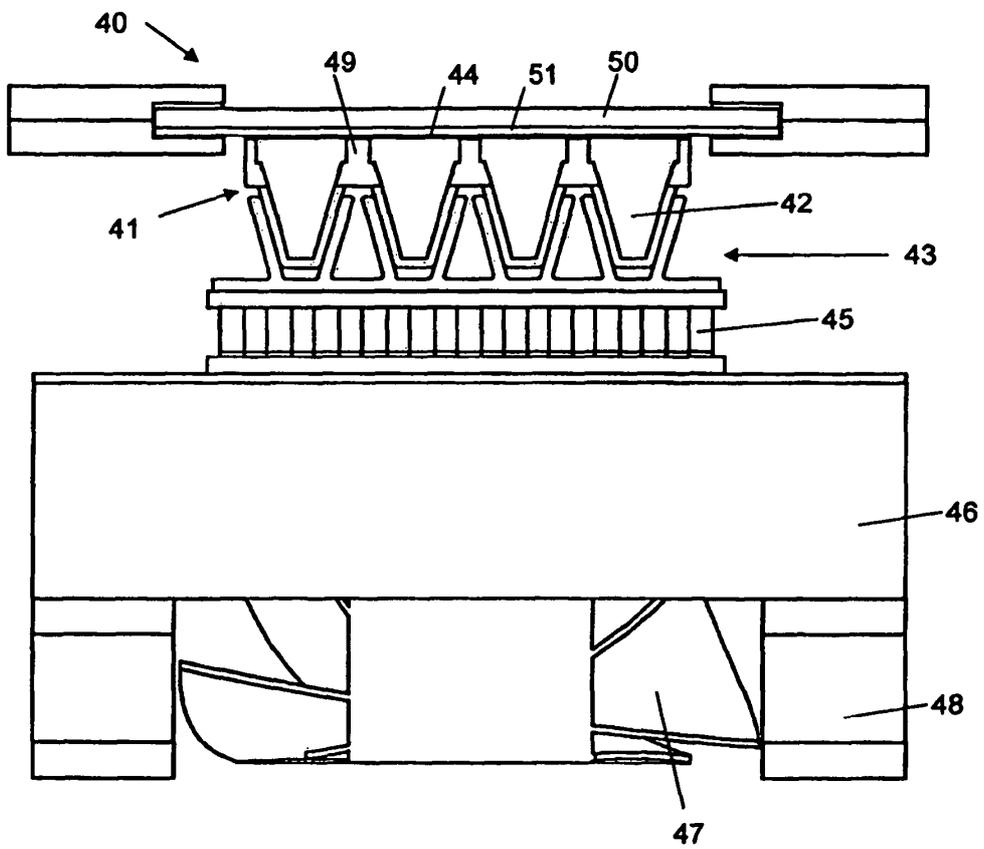


Figura 7

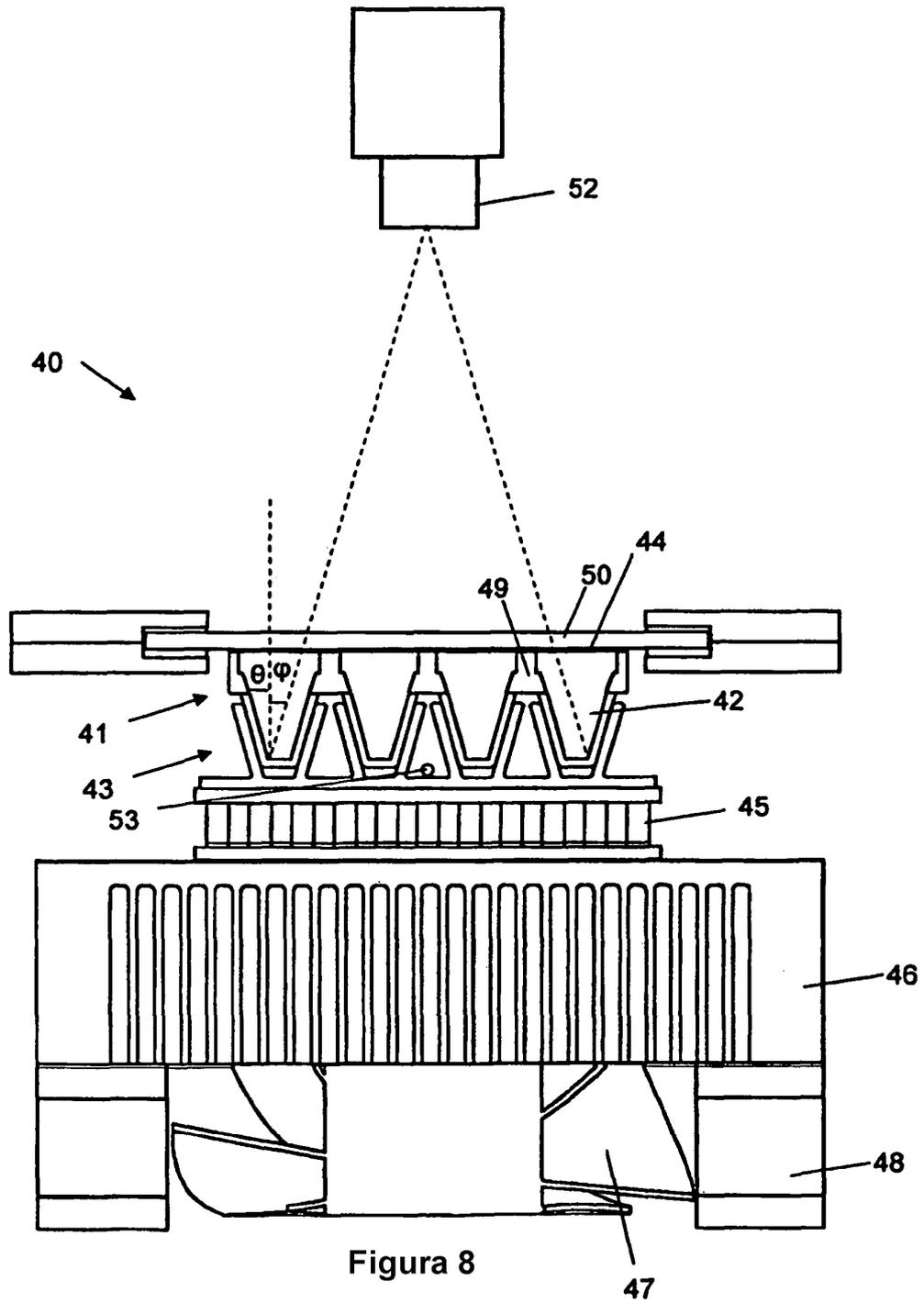


Figura 8