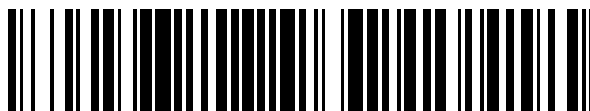


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 389 763**

51 Int. Cl.:

B01L 7/00 (2006.01)

B01L 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **10177401 .6**

96 Fecha de presentación: **20.07.2001**

97 Número de publicación de la solicitud: **2269738**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **05.01.2011**

54 Título: **Dispositivo para la amplificación de la reacción en cadena termo-dependiente de secuencias de ácidos nucleicos diana**

30 Prioridad:
28.07.2000 FR 0010029

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
31.10.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
31.10.2012

73 Titular/es:
PALL GENEDISC TECHNOLOGIES (100.0%)
1, rue du Courtil Parc d'Affaires CICEA
Bâtiment 1
5170 Bruz, FR

72 Inventor/es:
FESTOC, GABRIEL

74 Agente/Representante:
DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 389 763 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

Dispositivo para la amplificación de la reacción en cadena termo-dependiente de secuencias de ácidos nucleicos diana.

La presente invención se refiere al campo de la genética.

- 5 Más precisamente, la presente invención se refiere a un dispositivo para la amplificación de secuencias nucleicas diana y a los modos de utilización de este dispositivo.

La presente invención tiene como objetivo principalmente permitir la detección y, llegado el caso, la cuantificación en tiempo real, de secuencias de ácido nucleico diana en una o varias muestras.

- 10 La detección de secuencias nucleicas diana es una técnica cada vez más utilizada en numerosos campos, y el abanico de aplicaciones de esta técnica está llamado a extenderse a medida que sea más fiable, más económica y más rápida. Así, en salud humana, la detección de ciertas secuencias de ácido nucleico permite en ciertos casos un diagnóstico fiable y rápido de infecciones víricas o bacterianas. Igualmente, la detección de ciertas particularidades genéticas puede permitir identificar susceptibilidades a ciertas enfermedades, o establecer un diagnóstico precoz de enfermedades genéticas o neoplásicas. La detección de secuencias nucleicas diana se utiliza también en la industria agroalimentaria, principalmente para asegurar la trazabilidad de productos, para detectar la presencia de organismos genéticamente modificados e identificarlos, o para efectuar un control sanitario de los alimentos.

- 15 Los procedimientos de detección basados en ácidos nucleicos implican casi sistemáticamente una reacción de hibridación molecular entre una secuencia nucleica diana y uno o varias secuencias nucleicas complementarias de dicha secuencia diana. Estos procedimientos presentan numerosas variantes como las técnicas conocidas por el experto en la técnica bajo las expresiones "técnicas de transferencia" (*blot*, *dot blot*, *Southern blot*, Polimorfismo de longitud del fragmento de restricción, etc.), o también como los sistemas miniaturizados sobre los que se fijan previamente las secuencias complementarias de las secuencias diana ("biochips"). Dentro del marco de estas técnicas, las secuencias nucleicas complementarias se llaman generalmente sondas. Otra variante, que puede constituir en sí misma la base de un procedimiento de diagnóstico o no ser más que una etapa suplementaria en una de las técnicas mencionadas anteriormente (con el fin principalmente de aumentar la concentración de la secuencia diana y, por lo tanto, la sensibilidad del diagnóstico), consiste en amplificar la secuencia de ácido nucleico diana. Se han descrito varias técnicas que permiten la amplificación específica de una secuencia de ácido nucleico, siendo la más utilizada la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP), o "Polymerase Chain Reaction" (PCR). Dentro del marco de esta última técnica, se utilizan secuencias nucleicas complementarias de las secuencias diana, llamadas cebadores, para amplificar dichas secuencias diana.

- 20 Las reacciones de PCR implican una repetición de ciclos, cuyo número varía generalmente de 20 a 50, y que están compuestos cada uno de tres fases sucesivas, a saber: desnaturalización, hibridación, elongación. Respectivamente, la primera fase corresponde a la transformación de los ácidos nucleicos bicatenarios en ácidos nucleicos monocatenarios, la segunda fase a la hibridación molecular entre la secuencia diana y los cebadores complementarios de dicha secuencia, y la tercera fase a la elongación de los cebadores complementarios, hibridados en la secuencia diana, por una ADN polimerasa. Estas fases se llevan a temperaturas específicas: generalmente 95°C para la desnaturalización, 72°C para la elongación, y entre 30°C y 65°C para la hibridación, según la temperatura de hibridación (T_m) de los cebadores utilizados. También es posible efectuar las etapas de hibridación y la elongación a la misma temperatura (generalmente 60°C).

- 35 Una reacción de PCR consiste, por lo tanto, en un encadenamiento de ciclos térmicos repetitivos a lo largo del cual el número de moléculas de ADN diana que sirve de matriz se duplica teóricamente en cada ciclo. En realidad, el rendimiento de la PCR es inferior a 100%, aunque la cantidad de producto X_n obtenido después de n ciclos es:

$$X_n = X_{n-1} (1 + r_n), \text{ en donde}$$

- 45 X_{n-1} es la cantidad de producto obtenido en el ciclo anterior, y r_n el rendimiento de la PCR en el ciclo n ($0 < r_n \leq 1$).

Considerando el rendimiento constante, es decir idéntico para cada ciclo, la cantidad de producto X_n obtenido después de n ciclos, a partir de una cantidad inicial X_0 es entonces:

$$X_n = X_0 (1 + r)^n \quad (A)$$

- 50 En realidad, el rendimiento r disminuye a lo largo de la reacción de PCR, a causa de varios factores, tal como una cantidad limitante de al menos uno de los reactivos necesarios para la amplificación, la inactivación de la polimerasa por esos pases repetidos a 95°C, o su inhibición por los pirofosfatos producidos por la reacción.

Debido a esta disminución del rendimiento, la cinética de una reacción de PCR presenta primero una fase exponencial (mientras que r es constante), que evoluciona luego hacia una fase de meseta cuando r disminuye.

Durante la fase exponencial, la ecuación (A) anterior es válida, y puede escribirse también:

$$\log (X_n) = \log (X_0) + n \log (1 + r)$$

Así, en la fase exponencial de la PCR, la curva que muestra la cantidad de producto, en una escala logarítmica, en función del número de ciclos, es una línea de pendiente $(1 + r)$ y que corta el eje de ordenadas en un valor igual al logaritmo de la concentración inicial.

- 5 La medida en tiempo real de la cantidad de producto obtenido, puede permitir por lo tanto conocer la concentración inicial de la matriz, lo que es particularmente útil en un gran número de aplicaciones, por ejemplo, para medir la carga vírica de un enfermo, o también para conocer la variabilidad de un transcriptoma.

10 Generalmente, las PCR implican volúmenes de reacción que van desde 2 a 50 μ l y se llevan a cabo en tubos, microtubos, capilares o sistemas conocidos por el experto en la técnica, bajo el término "microplacas" (en realidad, conjuntos de microtubos unidos). Cada lote de tubos o de recipientes equivalentes se debe calentar por lo tanto a tres temperaturas que se corresponden con las diferentes fases de la PCR, y esto tantas veces como el número de ciclos deseados.

15 La utilización de tubos o de sistemas similares obligan al usuario a efectuar múltiples manipulaciones para preparar tantos tubos y soluciones (conocidas por el experto en la técnica bajo la expresión "mix PCR") como secuencias diana se deseen amplificar, incluso a partir de una muestra única de ácidos nucleicos, con la excepción de los procedimientos de amplificación "multiplex", que permiten la amplificación de varias secuencias diana simultáneamente en el mismo recipiente, utilizando cebadores denominados poco específicos que pueden hibridarse con varias secuencias diana, como por ejemplo, la técnica RAPD - polimorfismo del ADN amplificado aleatoriamente, por sus siglas en inglés, o utilizando cebadores específicos pero en un número superior, permitiendo cada pareja de cebadores utilizada, la amplificación de una secuencia diana. Estas amplificaciones multiplex corresponden a casos
20 particulares y no son la norma. Además, no garantizan la ausencia de interacciones de una reacción de amplificación con otra, y por razones principalmente de posibles hibridaciones entre los cebadores, solo puede ser muy limitado el número de secuencias diana amplificadas por recipiente.

Estas diferentes manipulaciones implican numerosos inconvenientes.

- 25 En primer lugar, exigen mucho tiempo. En segundo lugar, no están exentas de riesgo desde el punto de vista de eventuales contaminaciones de un tubo a otro o desde el medio exterior (polvo, bacteria, aerosol o cualquier otro contaminante susceptible de contener moléculas de ácidos nucleicos o moléculas susceptibles de influir sobre la eficacia de la reacción de amplificación). Además, no aseguran una homogeneidad de volumen y de concentración en los reactivos de un tubo a otro. Finalmente, imponen la utilización de volúmenes manipulables manualmente,
30 generalmente superiores a 1 μ l, lo que tiene una incidencia sobre los costes ligados a la realización de las PCR, siendo los reactivos utilizados costosos.

35 La utilización de dispositivos diseñados para automatizar al menos parcialmente tales manipulaciones, permite paliar algunos de estos inconvenientes. Sin embargo, tales sistemas automatizados son relativamente caros y su utilización, por lo tanto, generalmente no se ve justificada económicamente más que en el caso de las PCR en grandes series, por ejemplo, para la secuenciación de genomas.

40 También existen ciertos sistemas automatizados que permiten realizar reacciones de PCR cinéticas. Como se ha visto anteriormente, la realización de una PCR cinética requiere cuantificar en tiempo real, y de manera específica, la secuencia diana amplificada. La utilización de un agente intercalante fluorescente en la mezcla de reacción, permite medir el aumento de la cantidad total de ADN de doble hebra en dicha mezcla. Sin embargo, este método no permite discriminar la amplificación de la secuencia diana con respecto al ruido de fondo o a una eventual amplificación no específica. Recientemente se han descrito varios sistemas de sondas para permitir medir específicamente la amplificación de una secuencia diana determinada. Se basan en oligonucleótidos complementarios de dicha secuencia, y están ligados a parejas de grupos de fluoróforos o fluoróforos/amortiguadores, de tal manera que la hibridación de la sonda con su diana, y los ciclos de amplificación sucesivos conllevan, dependiendo del caso, un
45 aumento o una disminución de la fluorescencia total de la mezcla, en proporción a la amplificación de la secuencia diana.

A título de ejemplos de sondas utilizables para realizar PCR cinéticas, se pueden citar el sistema TaqMan™ (ABI®), el sistema AmpliSensor™ (InGen), y el sistema Sunrise™ (Oncor®, Appligène®).

El sistema más utilizado actualmente es el sistema TaqMan™.

- 50 Este procedimiento asocia las actividades de ADN polimerasa y nucleasa 5'→3' de la Taq polimerasa durante la PCR. Su principio es el siguiente: además de dos cebadores de secuencia complementaria de la de la diana que se va a cuantificar, una sonda, llamada sonda indicadora, se añade en el medio de reacción. Tiene la capacidad de hibridarse con la diana en el cuerpo de la secuencia amplificada, pero ella misma no puede ser amplificada. En efecto, un grupo fosforilo añadido en el extremo 3' de la sonda, impide su extensión con la Taq polimerasa. Un derivado de la fluoresceína y un derivado de la rodamina se incorporan a la sonda, respectivamente en el extremos
55 5' y 3'. La sonda es de tamaño pequeño, como el derivado de la rodamina, situado en la proximidad de la fluoresceína, absorbe la energía emitida por la fluoresceína sometida a una fuente de excitación (fenómeno de

extinción).

Una vez que los cebadores se hibridan con la diana, durante la reacción de extensión, la Taq ADN polimerasa ataca la sonda por su actividad 5' nucleasa, liberando el grupo extintor y restableciendo así la emisión de fluorescencia. La intensidad de la fluorescencia emitida es proporcional entonces a la cantidad de productos formados en la PCR, lo que permite obtener un resultado cuantitativo. La fluorescencia emitida es proporcional al número de moléculas diana de partida. La cinética de desarrollo de la fluorescencia puede seguirse en tiempo real durante la reacción de amplificación.

Esta técnica presenta la ventaja de ser fácilmente automatizable. Un aparato que permite realizar esta técnica, el ABI Prism 7700™, es comercializado por Perkin-Elmer. Este aparato combina un termociclador y un fluorímetro. Es capaz de detectar el aumento de fluorescencia generada a lo largo de un ensayo de cuantificación según el procedimiento TaqMan™, gracias a las fibras ópticas situadas por debajo de cada tubo y conectadas a una cámara CCD que detecta, en tiempo real, la señal emitida por los grupos fluorescentes liberados a lo largo de la PCR. Los datos cuantitativos se deducen a partir de la determinación del ciclo en el cual la señal del producto de amplificación alcanza un cierto umbral determinado por el usuario. En efecto, varios estudios han mostrado que ese número de ciclos era proporcional a la cantidad de material inicial (Gibson, Heid y col. 1996; Heid, Stevens y col. 1996; Williams, Giles y col. 1998).

El número de aplicaciones potenciales de tal aparato es importante, tanto en la salud humana como en la industria agroalimentaria y de control de calidad. Desgraciadamente, el ABI Prism 7700™ y los otros pocos aparatos competidores comercializados actualmente son extremadamente caros. Además, solo pueden ser utilizados por un manipulador experto. En la práctica, por tanto, tales aparatos se utilizan solo en ciertas estructuras muy especializadas.

Por lo tanto, existe en la actualidad una necesidad real de un sistema de amplificación de ácidos nucleicos, en su caso, medido en tiempo real, y que no presente los inconvenientes citados anteriormente del estado de la técnica.

El objetivo de la presente invención es proporcionar un sistema que permite disminuir considerablemente el número de manipulaciones necesarias en la realización de un método para amplificar una pluralidad de secuencias diana y, en consecuencia, disminuir el tiempo necesario para esta operación.

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un sistema que minimiza los riesgos de contaminación de un recipiente a otro.

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un sistema que reduce los volúmenes de reactivos utilizados y por lo tanto los costes.

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un sistema que optimiza una distribución homogénea en el volumen y en la concentración de los reactivos necesarios para la PCR en los recipientes.

Otro objetivo es proporcionar a todos los usuarios potenciales, principalmente a los centros hospitalarios, los laboratorios de análisis clínicos, las industrias agroalimentarias y los laboratorios de control sanitario, un aparato de uso y mantenimiento cómodos, para efectuar amplificaciones de ácidos nucleicos cuantificadas en tiempo real de forma rutinaria.

En esta solicitud, se emplean varios términos, cuyos significados son los siguientes:

- Una "reacción de amplificación de ácidos nucleicos" hace referencia a cualquier método de amplificación de ácidos nucleicos conocido por el experto en la técnica. Se pueden citar, a título de ejemplos, y de manera no restrictiva, la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP), más comúnmente designada por el experto en la técnica bajo el acrónimo anglófono, PCR (*Polymerase Chain Reaction*), la TMA (*amplificación mediada por transcripción*, por sus siglas en inglés), la NASBA (*amplificación de secuencia de ácido nucleico* por sus siglas en inglés), la 3SR (*replicación de secuencias automantendidas*, por sus siglas en inglés), la amplificación por desplazamiento de hebra, o SDA por sus siglas en inglés y la LCR (*reacción en cadena de la ligasa*, por sus siglas en inglés).

La matriz inicial de la amplificación puede ser cualquier tipo de ácido nucleico, ADN o ARN, genómico, plasmídico, recombinante, ADNc, ARNm, ARN ribosómico, ARN vírico u otro. Cuando la matriz inicial es un ARN, se realiza en general una primera etapa de transcripción inversa para obtener una matriz de ADN. Esta etapa no se mencionará en general en este texto, ya que el experto en la técnica sabe exactamente cuándo y cómo realizarla. Se entiende que los dispositivos de la invención son utilizables para amplificar y eventualmente cuantificar específicamente secuencias de ARN así como de ADN. En el texto siguiente, el término "PCR" será por lo tanto el término genérico utilizado para designar tanto la PCR propiamente dicha, como la RT-PCR (transcripción inversa-Reacción en Cadena de la Polimerasa, por sus siglas en inglés).

- Entre las reacciones de amplificación citadas anteriormente, algunas son isotérmicas. Otras, principalmente la PCR y la LCR, implican calentar la mezcla de reacción a diferentes temperaturas a través del tiempo, de manera cíclica. Tales reacciones se llaman en esta memoria "reacciones de amplificación de ácidos nucleicos termo-

dependientes". En el texto que sigue, el dispositivo de la invención se describirá principalmente en su aplicación a la PCR. Sin embargo, es bien evidente que este dispositivo no está limitado a esta técnica, y que puede utilizarse también para cualquier reacción de amplificación de ácidos nucleicos, o para otras reacciones enzimáticas y/o de biología molecular. Este dispositivo está adaptado particularmente a las reacciones que necesitan volúmenes bajos y el pase cíclico de la mezcla de reacción a varias temperaturas, tal y como aparecerá claramente en lo que sigue.

5 • Uno de los objetivos de la presente invención es proporcionar un nuevo dispositivo para efectuar reacciones de amplificación denominadas "cuantitativas", es decir, que permiten determinar la concentración de secuencia diana presente inicialmente en la mezcla de reacción. Se han descrito varios tipos de reacciones de amplificación cuantitativas. Se pueden distinguir las amplificaciones cuantitativas basadas en el empleo de un patrón externo, las
10 amplificaciones competitivas, utilizando un patrón interno, y finalmente las amplificaciones cinéticas, cuyo principio se ha mencionado anteriormente, y que consisten en medir en tiempo real, el aumento de la cantidad de secuencia diana. Este tipo de amplificación será designado en esta memoria de manera intercambiable bajo las expresiones "amplificación cinética (de ácidos nucleicos)" "PCR cinética", "amplificación (de ácidos nucleicos) cuantificada en tiempo real", o también "PCR en tiempo real". Las expresiones entre paréntesis a veces se omiten.

15 • En esta solicitud, el término "reactivo" debe comprenderse en su sentido amplio, para designar cualquier elemento necesario bien en la reacción de amplificación propiamente dicha, bien en su detección. Siguiendo esta definición, las sales, los dNTP, los cebadores o también la polimerasa, son reactivos necesarios para la PCR. Igualmente, un agente intercalante fluorescente, o una sonda, se consideran en esta memoria reactivos participantes en la detección de los productos amplificados, aunque no reaccionen en el sentido literal.

20 Más adelante en la descripción detallada de la invención, se definirán otros términos que designan ciertos elementos del dispositivo de la invención.

Ciertos elementos del dispositivo están numerados con referencia a los dibujos, que ilustran algunos modos y variantes no limitativas de realización de la invención, y en los que:

- la figura 1 representa una vista lateral de una realización simplificada del dispositivo según la presente invención;
- 25 • la figura 2 representa una vista superior de la placa calefactora, en el caso en que los bloques (21 a 23) son sectores de disco (figura 2A), y en el caso en que están constituidos por sectores de corona (figura 2B);
- la figura 3 representa una vista en perspectiva de un primer ejemplo de realización del cartucho (1), provisto de cámaras de reacción y de una parte de los medios de desplazamiento;
- la figura 4 representa una vista transversal de este cartucho en acuerdo parcial con la invención según la línea AA;
- 30 • la figura 5 representa una vista superior de la parte inferior (base) de un segundo modo de realización particular del cartucho según la invención. Las dimensiones están dadas a título puramente indicativo, y no son en modo alguno limitantes;
- la figura 6 representa una vista transversal de este cartucho inferior, según la línea AA de la figura 5;
- la figura 7 representa una vista superior de la parte superior (tapa) del cartucho representada en las figuras 5 y 6;
- 35 • la figura 8 representa una vista transversal de este cartucho superior, a lo largo de la línea BB de la figura 7;
- la figura 9 representa un cartucho completo, constituido por la base representada en las figuras 5 y 6 (líneas continuas), y la tapa representada en las figuras 7 y 8 (líneas discontinuas);
- la figura 10 muestra tres modelos del cartucho de la figura 9, por encima del cual se encuentran los medios de excitación/medida de la fluorescencia (5);
- 40 • la figura 11 muestra una sección esquemática de un canal (12), que posee un dispositivo de "pérdida de carga".

La invención se refiere en primer lugar a cualquier dispositivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16.

La temperatura de cada zona de la placa puede ser homogénea o, si procede, esta temperatura puede variar siguiendo un gradiente.

45 Varios tipos de reacciones de biología molecular necesitan situar la mezcla de reacción a diferentes temperaturas en función del tiempo. Esto es el caso, por ejemplo, cuando se desea inactivar una enzima después de haberla utilizado (por ejemplo, una nucleasa de restricción), o para someter a ensayo la estabilidad de un complejo. En este último caso, se puede prever situar un complejo (por ejemplo, un complejo antígeno/anticuerpo, o receptor/ligando), en el que uno de los elementos está acoplado a un fluoróforo y el otro a un amortiguador de la fluorescencia, en una de
50 las cámaras de reacción del dispositivo. La placa se programa entonces para presentar varias temperaturas en un orden creciente, en su caso, en forma de un gradiente. La estabilidad del complejo se somete entonces a ensayo

desplazando el cartucho sobre la placa, de manera que la temperatura de la cámara de reacción aumenta progresivamente, y observando el aumento de la fluorescencia, con ayuda de medios de excitación/medición de la fluorescencia, situados junto a la cámara de reacción. El aumento de la fluorescencia se traduce entonces como la disociación del complejo.

- 5 El dispositivo de la invención está adaptado particularmente a reacciones que necesitan una variación cíclica de la temperatura de las cámaras de reacción, que es el caso de algunas reacciones de amplificación de ácidos nucleicos, por ejemplo, de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), o de la reacción en cadena de ligasa (LCR).

La invención se refiere por lo tanto en particular a un dispositivo para la amplificación en cadena termo-dependiente de secuencias de ácidos nucleicos diana, de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 16.

- 10 Tal sistema según la invención es menos complejo que los sistemas de la técnica anterior, en la medida en la que las temperaturas necesarias en los ciclos de amplificación en cadena están aseguradas por zonas distintas de temperaturas constantes y no por una placa en la que hay que variar la temperatura.

- 15 Es importante observar que las reacciones de amplificación en cadena termo-dependientes necesitan el pase de las muestras por al menos dos temperaturas. Por ejemplo, la LCR necesita en cada ciclo una fase a aproximadamente 95°C para desnaturalizar el ADN diana, luego una fase entre 55 y 65°C (en función de la Tm de las sondas), para dar lugar a la hibridación/ligación. En lo que se refiere a la PCR, cada ciclo se descompone en general en tres fases, a saber, la desnaturalización a aproximadamente 95°C, la hibridación cuya temperatura depende de la Tm de las sondas, y la elongación, habitualmente realizada a 72°C. Sin embargo es posible realizar PCR que tienen ciclos simplificados, en los que la hibridación y la elongación se hacen a la misma temperatura, de manera que cada ciclo
20 necesite solamente dos temperaturas diferentes.

Se podrá considerar diferentes variantes del dispositivo descrito anteriormente. Según una variante preferida de la invención, el sistema comprende las características siguientes:

- cebadores específicos de secuencias diana que se van a amplificar se distribuyen previamente en las cámaras de reacción (13),
- 25 - el depósito (11) sirve para recibir un fluido compuesto principalmente por una muestra de ácidos nucleicos que se van a analizar y los reactivos necesarios para una reacción de amplificación en cadena de la polimerasa, con la excepción de los cebadores.
- la placa calefactora (2) presenta tres zonas distintas que se pueden calentar a tres temperaturas diferentes, que se corresponden a las tres fases de los ciclos de la reacción en cadena de la polimerasa.

- 30 Según una variante preferida, es posible distribuir, a partir de un depósito, un fluido que contiene una muestra de ácidos nucleicos que se va a analizar y los reactivos necesarios para la PCR, en una pluralidad de cámaras de reacción que contienen los cebadores específicos de secuencias diana de los ácidos nucleicos que se van a amplificar, y autorizar el procedimiento de amplificación, sometiendo sucesivamente el contenido de las cámaras a diferentes temperaturas (a saber, las necesarias para la desnaturalización, la hibridación y la elongación) una
35 multitud de veces, gracias a un movimiento relativo entre el cartucho que incluye dichas cámaras de reacción y dicha placa calefactora que presenta dos o tres zonas distintas que se pueden calentar a temperaturas diferentes.

- Si procede, las cámaras de reacción (13) pueden contener reactivos necesarios para una reacción de PCR en tiempo real, distintos a los cebadores mencionados anteriormente. En una realización preferida del dispositivo de la invención, las cámaras de reacción comprenden igualmente, además de los cebadores, una o varias sondas
40 específicas de la secuencia que se va a amplificar. La distribución de las sondas en las cámaras de reacción puede ser también de manera que ciertas cámaras contengan sondas específicas de las secuencias que se van a amplificar y otras cámaras contengan sondas testigo, que no reconocen a priori la secuencia que se va a amplificar. Estas sondas pueden estar marcadas y, si están presentes varias sondas en una misma cámara de reacción (por ejemplo, una sonda específica de la secuencia que se va a amplificar y una sonda testigo), estas sondas estarán
45 marcadas preferentemente con fluoróforos diferentes.

- En otra variante del dispositivo, se depositan inicialmente reactivos suplementarios, tal como los dNTP o sales, en las cámaras de reacción. Estos reactivos estarán entonces ausentes, o presentes en menor cantidad, en el fluido depositado en el depósito (11). En el caso extremo, todos los reactivos necesarios para la reacción de PCR, con la excepción de la matriz, se depositan en las cámaras de reacción (13), y el fluido depositado en el depósito (11)
50 comprenderá entonces únicamente la muestra de ADN (o ARN) que se va a amplificar.

- Las variantes descritas anteriormente suponen que varias reacciones se realizan en paralelo, con cebadores y/o sondas diferentes, sobre una misma muestra. Por lo tanto, se trata de la caracterización de una muestra única (o de algunas muestras si el depósito está dividido en algunos subdepósitos) siguiendo varios criterios. En ciertas aplicaciones, se desea por el contrario caracterizar una multitud de muestras siguiendo un criterio único o un menor
55 número de criterios. Esto es el caso por ejemplo, en la investigación, cuando se desea escrutar un banco de fagos o de bacterias para buscar la presencia de un gen dado. En este caso es necesario efectuar una PCR sobre un gran

número de muestras, a partir de una pareja de cebadores dados. El dispositivo de la invención se adapta también a este tipo de manipulaciones. Para ello, las muestras se depositan en las cámaras de reacción (13). Los cebadores pueden introducirse en el fluido depositado en el depósito (11), con los otros reactivos necesarios para la PCR. Por supuesto, esta configuración no excluye tampoco que ciertos reactivos distintos a la muestra que se va a analizar, sean depositados previamente en las cámaras de reacción (13).

Cualquiera que sea la variante del dispositivo elegido, y cualquiera que sean los reactivos depositados en las cámaras de reacción (13), se pueden depositar ventajosamente por un simple depósito líquido, seguido de un secado. La llegada del fluido proveniente del depósito (11) permite luego la puesta en disolución de estos reactivos. La cantidad de cada reactivo depositada se calcula en función del volumen de fluido que penetrará en cada cámara de reacción (13), de tal manera que la puesta en solución de los reactivos conduce a la concentración final deseada para cada uno de ellos. Estos cartuchos tal y como se han descrito anteriormente, en los que al menos una parte de las cámaras de reacción (13) comprenden reactivos que han estado cargados con un depósito fluido, seguido de un secado, de tal manera que estos reactivos se vuelven a poner en disolución con la llegada de un fluido en estas cámaras de reacción, son igualmente una parte integrante de la invención.

El dispositivo descrito anteriormente presenta la ventaja de permitir un llenado concomitante de todas las cámaras de reacción, lo que disminuye el tiempo de preparación y los riesgos de contaminación de una cámara a otra. Este dispositivo presenta igualmente la ventaja de poder ser miniaturizado e implica la utilización de volúmenes de reactivos más bajos que en el estado de la técnica.

Finalmente se debe señalar también que, gracias a la placa calefactora específica propuesta, la invención permite acelerar los ciclos de la PCR para efectuar las diferentes fases (desnaturalización, hibridación, elongación) ya que no es necesario hacer variar la temperatura de la placa calefactora o de la atmósfera como en el estado de la técnica, permitiendo el movimiento relativo entre el cartucho y la placa y someter rápida y sucesivamente el contenido de cada una de las cámaras de reacción a tres temperaturas distintas, dedicadas a cada una de estas fases. La utilización de volúmenes menores de reacción, y de un piso de poco espesor para el cartucho (1), permite también limitar la inercia térmica a nivel de las cámaras de reacción, y contribuir así a la rapidez de la reacción.

La invención se refiere igualmente a un dispositivo para la amplificación en cadena termo-dependiente de secuencias de ácidos nucleicos diana, medida en tiempo real, caracterizado porque comprende los mismos elementos que uno cualquiera de los dispositivos descritos anteriormente, y que comprende además medios ópticos (5) de excitación/medida de la fluorescencia, dispuestos de modo que excitan y miden en cada ciclo la fluorescencia del contenido de las cámaras de reacción.

Uno de los elementos particularmente originales de los dispositivos descritos anteriormente es el elemento denominado indistintamente placa o cartucho de reacción (1). Este elemento puede ser reciclable o, de manera preferida, consumible, y constituye en sí mismo un aspecto de la presente invención. Así, la invención utiliza preferentemente un cartucho de reacción que comprende una pluralidad de cámaras de reacción (13) y al menos un depósito (11) y que presenta las siguientes características:

- cada cámara de reacción está conectada con el depósito por un canal (12) que tiene una sección transversal dentro de un círculo de diámetro inferior a 3 mm,
- la capacidad del depósito es inferior a 10 ml,
- la disposición de las cámaras de reacción y de los canales en relación con el depósito, permite distribuir un fluido de forma homogénea en las cámaras de reacción, desde el depósito.

Preferentemente el diámetro de los canales se elegirá lo suficientemente bajo como para no permitir una distribución por gravedad del fluido presente en el depósito en las cámaras de reacción, esto para evitar un llenado no reproducible de estas cámaras. Este diámetro será, así, preferentemente inferior o igual a aproximadamente 0,2 mm. Respecto a este diámetro, se observará que la sección de estos canales será preferentemente circular pero podrá tener igualmente cualquier otra forma y principalmente poligonal, incluyendo así el "diámetro" de los canales su anchura más grande en sección.

El depósito destinado a recibir la muestra de ácidos nucleicos y los reactivos necesarios para la PCR podrá presentar una capacidad variable, comprendida, por ejemplo, entre aproximadamente 0,1 ml y aproximadamente 1 ml.

El cartucho comprende preferentemente entre aproximadamente 20 y aproximadamente 500 cámaras de reacción y, de manera más preferida, entre 60 y 100 cámaras de reacción.

El volumen de estas cámaras podrá variar igualmente según los modos de realización. Ventajosamente, estas cámaras presentan un volumen comprendido entre aproximadamente 0,2 y 50 μ l, preferentemente entre 1 μ l y 10 μ l.

En los cartuchos, la unión entre los canales (12) y el depósito (11) se hace en la periferia del depósito, y el fondo de dicho depósito está inclinado para asegurar la distribución de un fluido contenido en el depósito a nivel de la entrada

de los canales.

5 Nótese que un cartucho utilizado según la invención puede presentar múltiples formas. Sin embargo, según una variante preferida de la invención, este cartucho presenta una forma circular. El depósito está previsto sensiblemente en el centro del cartucho, estando repartidas las cámaras de reacción en círculo alrededor del depósito, y estando previstos los canales de conexión con el depósito a las cámaras, esencialmente de forma radial. Esta arquitectura permite optimizar el llenado de las cámaras de reacción desde el depósito central.

En una realización particular de cartuchos circulares de la invención, el fondo del depósito (11) es cónico.

10 Igualmente, preferentemente, dichas cámaras de reacción están previstas relativamente en la periferia de dicho cartucho. Así, es posible optimizar el número de cámaras de reacción que pueden ser previstas sobre el cartucho y llenadas desde el depósito central.

Según una variante de la invención, tal cartucho comprende tantos canales como cámaras de reacción. Sin embargo, algunas realizaciones, se podrán prever segmentos de canales comunes a varias cámaras de reacción.

Una de las ventajas de la presente invención es permitir una miniaturización del dispositivo que propone. Así, ventajosamente, el cartucho presenta preferentemente un diámetro comprendido entre aproximadamente 1 y 10 cm.

15 Una variante de los cartuchos de la invención descritos anteriormente, cualquiera que sea su geometría, consiste en dividir el depósito (11) en 2 a 20, preferentemente en 2 a 8 subdepósitos, permitiendo analizar simultáneamente varias muestras sobre un mismo cartucho. En este caso, cada una de las cámaras de reacción (13) está unida a uno solo de estos subdepósitos a través de un canal (12).

20 La profundidad de las cámaras de reacción (con respecto a los canales) puede variar también en función de los modos de realización de la invención. Según una variante preferida, estas cámaras presentan una profundidad comprendida entre aproximadamente 0,5 mm y 1,5 mm.

25 Nótese además que el espesor del cartucho depende de varios factores y principalmente del material que lo constituye. En la práctica, este cartucho está constituido preferentemente de plástico, preferentemente de policarbonato, cuyas propiedades físicas, ópticas y térmicas, son apropiadas para la realización de la presente invención. El espesor de los cartuchos de la invención está comprendido preferentemente entre 0,5 y 5 mm.

Con el fin de facilitar los intercambios térmicos entre el contenido de las cámaras de reacción y la placa, el espesor del "suelo" de estas deberá ser, de forma preferente, lo más delgado posible. Este espesor depende del material utilizado para realizar el cartucho. Preferentemente, está comprendido entre 0,05 y 0,5 mm, por ejemplo, aproximadamente 0,25 mm.

30 Las cámaras de reacción de los cartuchos de la invención están cerradas preferentemente con una pared superior transparente (17), por ejemplo, de plástico transparente, con el fin de permitir la excitación y la medición de la fluorescencia del fluido de reacción, en buenas condiciones.

En una realización particular de la invención, las cámaras están provistas de respiraderos (sistema abierto), permitiendo que escape el aire que contienen durante el llenado con el fluido que proviene del depósito.

35 En el caso anterior, en el que las cámaras (13) están provistas de respiraderos (14), los canales (12) están constituidos preferentemente por al menos dos partes de diámetros diferentes (121 y 122), siendo inferior el diámetro de la segunda parte (122) al de la primera parte (121), para crear una pérdida de carga en el canal (12). Así, si un canal se llena más rápidamente que otro bajo el efecto de la presión, el fenómeno de pérdida de carga permite parar la progresión del fluido en el o los canales cuya primera parte (121) está llena, hasta que todos los canales estén llenos de la misma manera. Esto permite "pre-calibrar" los volúmenes para cada canal, con el fin de asegurar un llenado homogéneo de las diferentes cámaras de reacción. La segunda parte del canal (122) puede estar constituida, por ejemplo, por un capilar de vidrio, de diámetro mucho menor que la primera parte (121), estando dicho capilar incluido en un cartucho de plástico.

40

45 También es posible prever recintos (15) en donde desembocan los respiraderos (14) de las cámaras de reacción. Estos recintos poseen una abertura (16) hacia el exterior del cartucho (sistema abierto), y tienen la ventaja, por una parte, de recuperar sin contaminación cualquier exceso de fluido que saldría de las cámaras de reacción por los respiraderos (14) y, por otra parte, de poder cerrarse después del llenado de las cámaras de reacción. Este cierre puede hacerse, por ejemplo, utilizando una banda adhesiva, y permite pasar a un sistema cerrado para efectuar la amplificación propiamente dicha. Esto permite evitar o al menos limitar la evaporación del fluido contenido en el cartucho (1). Esta realización de la invención está ilustrada en la figura 11.

50

Alternativamente, es posible trabajar en un sistema cerrado desde el llenado de las cámaras de reacción, provocando una disminución de la presión en el cartucho seguida de un restablecimiento de la presión, como se detallará más adelante. Estos cartuchos en los que las cámaras de reacción no poseen otra abertura que la llegada del canal (12) (cámaras de reacción denominadas "cerradas") forman igualmente parte de la invención.

Los cartuchos descrito anteriormente, previstos bien para un uso en un sistema abierto, bien para un uso en un sistema cerrado, comprenden preferentemente una abertura adaptable a los medios (4) de modulación de la presión en el depósito (11), permitiendo desplazar el fluido presente en el depósito hacia las cámaras de reacción.

5 La invención se refiere igualmente a un procedimiento de llenado en un sistema cerrado de las cámaras de reacción (13) de un cartucho (1), tal como se ha descrito en el párrafo anterior, en la variante en la que las cámaras de reacción están cerradas, comprendiendo este procedimiento las etapas siguientes:

- llenar al menos parcialmente el depósito (11) con un fluido,
- conectar el cartucho (1) a los medios (4) de modulación de la presión,
- aplicar una presión inferior en el interior del cartucho, luego restablecer la presión.

10 En una variante de los cartuchos de la invención, cada canal (12) está equipado con una cavidad anti-reflujo (123) a nivel de su unión con el depósito (11), estando constituida dicha cavidad anti-reflujo por una porción de canal sensiblemente vertical, de un diámetro superior o igual al del canal (12). Esta variante presenta dos ventajas principales. Por una parte, estas cavidades anti-reflujo permiten evitar las contaminaciones cruzadas en caso de retorno accidental del fluido hacia el depósito (11), o en el caso en el que todo el fluido no hubiera entrado en los canales. Por otra parte, estas cavidades permiten prever, en los dispositivos de la invención, un tapón cuyos dientes casan con en estas entradas verticales, con el fin de sellar los canales después de dirigir el fluido de reacción, pero antes de la reacción de amplificación. Esto permite trabajar en un sistema perfectamente cerrado, y evitar de este modo todo riesgo de contaminación y de evaporación. Sin embargo, es importante señalar que las cavidades anti-reflujo, y la utilización de un tapón a nivel del depósito para sellar la entrada de los canales del lado del depósito, pueden ser empleadas también en el caso de sistemas abiertos tales como los que se han descrito anteriormente, en donde las cámaras de reacción están provistas de respiraderos.

En una realización preferida de los cartuchos de la invención, una parte al menos de las cámaras de reacción (13) comprende oligonucleótidos. De manera más preferida, cada una de las cámaras de reacción (13) comprende dos cebadores específicos de una secuencia de ácido nucleico que se va a amplificar y, facultativamente, una o varias sondas marcadas específicas de dicha secuencia. Tal sonda puede estar marcada de manera que su señal aumente cuando se hibrida con su secuencia diana (sistema Sunrise™), o de manera que la elongación a partir de una hebra sobre la cual se hibrida conlleva una disminución o un aumento de la señal (sistema AmpliSensor™ o sistema TaqMan™, respectivamente). La presencia de tales sondas en las cámaras de reacción permite realizar amplificaciones cuantificadas en tiempo real, con un dispositivo de la invención que dispone de medios (5) de excitación / medición de la fluorescencia, tal como se han descrito anteriormente. Sondas testigo no específicas de la secuencia que se va a amplificar, y marcadas de una manera diferente a las sondas específicas, se pueden utilizar también para detectar una posible contaminación.

En la realización de la invención descrita anteriormente, en donde las cámaras de reacción comprenden cebadores y, facultativamente, una o varias sondas, estas sondas y cebadores diferentes se elegirán preferentemente de tal forma que sus temperaturas de fusión (Tm) respectivas sean próximas. En particular, la Tm de diferentes cebadores estará comprendida preferentemente en un mismo intervalo de aproximadamente 5°C. De la misma manera, las diferentes sondas tendrán preferentemente una Tm comprendida en un mismo intervalo de 5°C, que puede ser diferente del intervalo de las Tm de los cebadores. En este caso, las sondas se elegirán de tal forma que su Tm sea superior a la de los cebadores, siendo entonces la diferencia entre la Tm de diferentes categorías de oligonucleótidos preferentemente del orden de 5°C. La temperatura de hibridación retenida para efectuar la amplificación se corresponde entonces a las temperaturas de fusión más bajas de los cebadores.

Las cámaras de reacción (13) de los cartuchos de la invención pueden comprender también, además de los cebadores y las sondas posibles, uno o varios otros reactivos necesarios para la reacción de PCR o para medir la amplificación. Se puede tratar, por ejemplo, de sales, de dNTP, o de un agente intercalante fluorescente de ADN de doble hebra, de tipo SybrGreen (marca registrada). Como se ha mencionado anteriormente, todos estos reactivos están depositados ventajosamente a nivel de las cámaras de reacción (13) mediante el depósito de una solución líquida, seguida de secado.

Según un modo de realización alternativo de los cartuchos de la invención, los cartuchos están previstos para escrutar un gran número de muestras con pocos criterios. Esto implica que el usuario de estos cartuchos puede depositar fácilmente sus muestras en cada una de las cámaras de reacción (13). Para ello, el cartucho puede poseer, por ejemplo, una tapa desmontable que cuando se retira da acceso directo a las cámaras de reacción. Tales cartuchos pueden cargarse también previamente y comprender, a nivel de las cámaras de reacción (13), uno o varios reactivos necesarios para la amplificación y/o para su detección.

Por supuesto, los dispositivos de la invención mencionados anteriormente pueden comprender uno o varios cartuchos que corresponden a cualquier cartucho descrito anteriormente.

En la realización particular del dispositivo de la invención, en donde el cartucho es circular, las distintas zonas de calentamiento de la placa calefactora (2) están repartidas preferentemente a lo largo de porciones de disco (figura

2A) o de corona (2B). Cada porción puede calentarse a una temperatura distinta para llevar sucesivamente el contenido de las cámaras de reacción a las temperaturas distintas deseadas, gracias a los medios de desplazamiento (3) relativos entre el cartucho (1) y la placa calefactora (2). Con el fin de limitar los problemas de evaporación y de condensación en el cartucho (1), los termobloques son de forma preferente suficientemente grandes para calentar también una parte de los canales, como está representado, por ejemplo, en la figura 11, dentro del marco de un cartucho rectangular.

Es importante señalar que el número de zonas de calentamiento distintas puede ser igual a dos, tres o más. Por ejemplo, en el caso de una PCR con dos temperaturas, la placa podrá presentar una zona a 95°C para la desnaturalización de los ácidos nucleicos de doble hebra, y una zona a 60°C para la hibridación de los cebadores y la elongación. En el caso de una PCR con tres temperaturas, la placa presentará una zona a 95°C (desnaturalización), una zona entre 40 y 70°C (hibridación de los cebadores) y una zona a 72°C (elongación). Finalmente, la placa puede presentar un número de zonas superior a tres, por ejemplo, para bloquear provisionalmente la reacción en un momento dado de cada ciclo. La placa puede presentar también un número de zonas que sea múltiplo de dos o tres, de tal manera que un recorrido del cartucho corresponde a varios ciclos de PCR. Finalmente, es importante señalar que el tamaño relativo de las diferentes zonas de calentamiento se elige de forma ventajosa proporcionalmente a la duración de la incubación deseada para el fluido de reacción, a la temperatura de dicha zona. Así, en la placa representada en la figura 2B, el termobloque 21, dedicado a la etapa de desnaturalización, tiene una superficie dos veces menor que la de los termobloques destinados a las etapas de hibridación y de elongación (bloques 22 y 23, respectivamente). Eligiendo una velocidad de rotación relativa del cartucho sobre la placa, de tal manera que una rotación de 360° se efectúa en 150 segundos, se obtiene por lo tanto ciclos en los que la desnaturalización dura 30 segundos, la hibridación 1 minuto y la elongación 1 minuto.

Acerca de los medios de desplazamiento se observa que, según un modo preferido de realización de la invención, la placa (2) está fija y el cartucho (1) es movido gracias a los medios de desplazamiento (3).

Sin embargo, en otros modos de realización, se podrá igualmente prever un cartucho fijo y una placa calefactora en movimiento gracias a dichos medios de desplazamiento.

En el modo de realización particularmente preferido de la invención, según el cual el cartucho es circular, los medios de desplazamiento (3) permiten la rotación de dicho cartucho y/o de dicha placa.

Se puede prever un elemento conductor entre el cartucho y la placa calefactora. Sin embargo, según una variante preferida de la invención, dicho cartucho está en contacto directo con dicha placa calefactora. En este caso, dicha placa está provista ventajosamente de un revestimiento que favorece el desplazamiento entre dicho cartucho y dicha placa. Tal revestimiento puede estar constituido por ejemplo, por Teflón (marca registrada).

Tal y como se ha indicado anteriormente, la placa calefactora del sistema puede presentar al menos dos o tres zonas que se pueden calentar a temperaturas distintas. Preferentemente, esta placa está constituida por dos o tres bloques térmicos independientes ("termobloques") distintos, unidos a los medios de programación de su temperatura. En el caso en el que la placa comprende tres termobloques (21 a 23), el primero de estos termobloques (21) se calienta a la temperatura de desnaturalización, el segundo (22) a la temperatura de hibridación, el tercero (23) a la temperatura de elongación. La utilización de tales termobloques de temperatura constante simplifica la realización de la placa calefactora.

Los medios de desplazamiento relativo del cartucho con respecto a la placa pueden realizarse de múltiples formas. Según un modo de realización preferido, ilustrado en la figura 10, el cartucho (1) presenta por debajo una parte saliente central (181) que comprende una muesca (182), de tal manera que la parte saliente (181) se encaja en la placa calefactora (2) y une el cartucho (1) con los medios de desplazamiento (3) a nivel de un taco o eje (32) puesto en movimiento por un micromotor (31). La parte saliente (181) permite por lo tanto por una parte, posicionar el cartucho con respecto a una placa (2) tal como la representada en la figura 2B, y por otra parte, asegurar su unión con los medios de puesta en movimiento (3).

Según un modo de realización alternativo, representado en las figuras 1 y 3, el cartucho presenta al menos una oreja (183) y los medios de desplazamiento (3) incluyen al menos un eje (32) que coopera con dicha oreja para inculcar a dicho cartucho un movimiento rotativo.

El modo de desplazamiento relativo entre la placa y el cartucho podrá variar según los modos de realización. Podrá tratarse de un desplazamiento con velocidad continua o intermitente. La velocidad de desplazamiento podrá ser constante o variar en el tiempo.

Ventajosamente, el sistema según la invención comprende igualmente medios ópticos de excitación/medición de la fluorescencia, previstos por ejemplo, por encima o al lado de dicho cartucho. Según una variante preferida de la invención, estos medios constituirán un sistema único y fijo. Una ventaja de una variante preferida de la invención, según la cual el cartucho es circular y movido con un desplazamiento rotativo, es poder llevar sucesivamente cada cámara de reacción a dicho sistema óptico, reduciendo así su complejidad. Un sistema de seguimiento, situado por ejemplo, sobre el cartucho (1), permite determinar a cada instante qué cámara de reacción está situada frente al sistema óptico.

Los medios para la conducción del fluido presente en dicho depósito hacia dichas cámaras de reacción pueden realizarse de diferentes formas. Como ya se ha descrito anteriormente, se pueden distinguir dos categorías de modos de direccionamiento del fluido hacia las cámaras de reacción: el direccionamiento en sistema abierto, que supone un aumento de presión a nivel del depósito y la presencia de respiraderos (14) a nivel de las cámaras de reacción, y el direccionamiento en sistema cerrado, que empieza por el contrario se inicia mediante el establecimiento de una presión inferior en el cartucho (1), seguido de un restablecimiento de esta presión.

Los medios (4) de conducción del fluido a las cámaras de reacción difieren según el modo de realización elegido. Así, en un sistema abierto, el fluido contenido en el depósito está distribuido a presión en las cámaras de reacción, para permitir un llenado uniforme en estas cámaras. En este caso, los medios de conducción (4) incluyen preferentemente un dispositivo de pistón (41) cuya velocidad de penetración en el depósito se calculará para favorecer el llenado adecuado de las cámaras de reacción. Alternativamente, estos medios de conducción incluyen una bomba conectada para aumentar la presión en el depósito (11).

Como se ha visto anteriormente, otra variante preferida de la invención implica trabajar en un sistema cerrado. El fluido contenido en el depósito se distribuye entonces en las cámaras de reacción de la manera siguiente: inicialmente, se crea una presión inferior en el interior del cartucho, en su caso, por un dispositivo de pistón o una bomba (42), conectada esta para disminuir la presión en el cartucho (1). A continuación la presión se restablece, lo que permite que el fluido entre en los canales y llene las cámaras de reacción periféricas.

La invención se refiere igualmente a cualquier procedimiento de amplificación de ácido nucleico gracias a un sistema tal como se ha descrito anteriormente, caracterizado porque comprende las etapas que consisten en:

- llenar al menos parcialmente el depósito (11) con un fluido que contiene una muestra de ácidos nucleicos que se va a analizar así como todo lo necesario para una reacción de amplificación, con la excepción de los cebadores y, facultativamente, un agente intercalante fluorescente de ácidos nucleicos;

- distribuir dicho fluido en las cámaras de reacción (13) previstas en el cartucho (1), en las cuales se distribuyen previamente los cebadores y, facultativamente, una o varias sondas marcadas específicas de la secuencia nucleica diana;

- poner en marcha los medios de desplazamiento relativo entre el cartucho y la placa calefactora para calentar sucesivamente, y tantas veces como se desee, el contenido de cada cámara a las temperaturas definidas por las dos, tres o más zonas de dicha placa calefactora.

En una variante del procedimiento anterior, se distribuyen previamente los reactivos necesarios para la reacción de amplificación y/o para la detección de los productos de amplificación, y distintos de los cebadores y de las sondas, en las cámaras de reacción (3) del cartucho (1). El fluido introducido en el depósito (11) no contiene entonces estos reactivos.

La etapa de distribución del fluido en las cámaras de reacción (13) se efectúa aplicando una presión inferior en el interior del cartucho y restableciendo a continuación la presión (sistema cerrado), o aumentando la presión a nivel del depósito (11), siempre que las cámaras de reacción estén provistas de respiraderos (sistema abierto).

La invención, así como las diferentes ventajas que presenta, se comprenderán mejor a partir de la siguiente descripción de algunos modos no limitativos de realización de la misma, ilustrados en las figuras.

Ejemplo 1: modo de realización simplificado del dispositivo de la invención.

El sistema de detección y de cuantificación de secuencias nucleicas diana representadas en la figura 1 comprende un cartucho circular de plástico de 2 mm de espesor que presenta un diámetro de 5 cm. Este cartucho (1) está provisto de un depósito central (11) y se describirá con más en detalle haciendo referencia a continuación en las figuras 3 y 4. La capacidad del depósito es, dentro del marco del presente modo de realización, de 400 µl. Su suelo es plano pero se notará que en otros modos de realización podrá estar abombado para facilitar el paso del fluido hacia las cámaras, sin formación de burbujas de aire, principalmente con el fin del direccionamiento cuando el depósito está prácticamente vacío.

El sistema comprende además una placa calefactora (2) en contacto directo con la cara inferior del cartucho (1) y unos medios de desplazamiento (3) del cartucho (1) con respecto a la placa calefactora (2). Estos medios de desplazamiento incluyen un micromotor (31) unido a dos ejes (32) que cooperan con dos orejas (183) del cartucho (1) para impartir al mismo un movimiento rotativo sobre la placa calefactora (2), quedando ésta fija en cuanto al mismo.

El sistema descrito comprende igualmente un pistón (41) destinado a cooperar con dicho depósito (11) así como un dispositivo óptico (5) de excitación/medición de la fluorescencia (fuente emisora que permite una excitación a una longitud de onda dada y programable, y receptor de la fluorescencia emitida) fijo y situado encima del cartucho (1) y de la placa calefactora (2).

Como se puede observar en la figura 2A, la placa calefactora (2) está constituida por tres bloques metálicos (21, 22 y 23) (a continuación denominados termobloques) en forma de porciones de discos. Se observa que en este modo de realización, estos termobloques presentan sensiblemente el mismo tamaño pero que en otros modos de realización, podrán presentar un tamaño diferente, entendiéndose el tamaño como la superficie angular ocupada en vista desde arriba. Cada termobloque (21, 22 y 23) está concebido para poder calentarse a una temperatura constante y programable que se corresponde a una de las fases (desnaturalización, hibridación o elongación) de los ciclos de amplificación (PCR), en general respectivamente 94°C para la desnaturalización, 72°C para la elongación, y entre 30-40 y 65-70°C para la hibridación según la T_m (temperatura de hibridación) de los cebadores utilizados. Las temperaturas de los termobloques podrán controlarse por cualquier medio conocido por el experto en la técnica.

5
10
15

En referencia a la figura 3, el cartucho (1) está provisto de un depósito central (11) con capacidad para 400 µl, unido a 36 cámaras de reacción (13) a través de tantos canales (12), distribuidos uniformemente sobre toda la periferia del cartucho (en la figura 3, no se ha representado el conjunto de los canales y de las cámaras sino solamente algunos de ellos). Estas cámaras de reacción (13) están provistas además de respiraderos (14) que desembocan sobre el borde del cartucho (1). En el presente modo de realización, los canales presentan un diámetro de 0,2 mm y el volumen de las cámaras de reacción es de 2,5 microlitros. En otros modos de realización, este diámetro y este volumen, por supuesto, podrán ser diferentes.

Como se ha precisado anteriormente, este cartucho (1) está provisto igualmente de dos orejas (183) agujereadas cada una por un orificio para dejar pasar un eje (32) unido al micromotor (31).

20

Según la figura 4, las cámaras de reacción presentan una profundidad de 1 mm. Su suelo presenta un espesor de 0,2 mm aproximadamente. Este espesor es suficientemente delgado para facilitar buenos intercambios térmicos entre las cámaras (13) y los termobloques (21, 22 y 23). Las cámaras de reacción (13) están cerradas en su parte superior por una pared (17) transparente, que forma igualmente la pared del depósito (11).

La utilización del dispositivo representado es la siguiente:

25

El depósito central (11) está destinado a recibir la muestra de ácidos nucleicos que se va a analizar así como todo lo necesario para una reacción de amplificación y, facultativamente, un agente intercalante fluorescente de ácidos nucleicos (el conjunto se denomina de ahora en adelante fluido), con la excepción de los cebadores distribuidos previamente en cada cámara de reacción periférica 10.

30

Dentro del marco del presente modo de realización, el usuario sitúa en el depósito central 90 µl (es decir 36 veces 2,5 µl) de fluido, en los que 75 ng son ácidos nucleicos. Las concentraciones de reactivos de dicho fluido son las siguientes:

35

- dNtP: 200 µM
- Tampón Taq: 1 x
- MgCl₂: 1,5 mM
- Taq: 4 U
- SybrGreen (marca registrada): 1 x
- H₂O: csc

40

Cada cámara 10, salvo algunas con fines de testigos negativos, contiene dos cebadores específicos de una secuencia diana que se va a amplificar, y facultativamente una o varias sondas marcadas, lo que permite una medición específica posterior de la fluorescencia. En el presente modo de realización, se han distribuido 10 ng de cada cebador en cada cámara salvo en las que sirven de testigo negativo.

45

Después de haber llenado parcialmente el depósito (11) con el fluido cuyo volumen es igual a la suma de los volúmenes de las cámaras (el volumen de una cámara está definido como el producto de su superficie de "suelo" por su profundidad), se acciona el pistón (41) para distribuir este fluido en la pluralidad de cámaras de reacción (13). Este pistón permite aumentar la presión en el seno del depósito (11) y permite el paso del fluido a los canales hacia las cámaras. La velocidad de desplazamiento del pistón en el depósito es de aproximadamente 1 mm por segundo y dicho desplazamiento se detiene a un nivel que depende del volumen de fluido que se va a dirigir a las cámaras.

50

El pequeño diámetro de los canales (12) permite impedir la difusión del fluido desde el depósito (11) hacia los canales (12) y las cámaras (13) bajo el efecto de la gravedad (a esta escala, los procesos habitualmente insignificantes como las fuerzas capilares se vuelven importantes), y en el caso presente bastan para mantener el fluido en el depósito). Gracias a los respiraderos (14), se descarga el aire presente en las cámaras (13), lo que asegura el llenado de las mismas.

55

Lo termobloques (21, 22, 23) se calientan a las tres temperaturas que corresponden a las tres temperaturas de las fases de la PCR (o a temperaturas ligeramente superiores teniendo en cuenta eventuales pérdidas térmicas entre la placa calefactora (2) y el cartucho (1)) y se utilizan los medios de desplazamiento (3) para animar con un movimiento giratorio que el cartucho (1) pase sucesivamente y tantas veces como se desee, cada cámara de reacción por encima de los tres termobloques.

Más precisamente, el bloque (21) se lleva a la temperatura correspondiente a la fase de desnaturalización (94°C), el

termobloque (22) se lleva a la temperatura correspondiente a la fase de hibridación (36°C) y el termobloque (23) se lleva a la temperatura correspondiente a la fase de elongación (72°C).

5 En el presente modo de realización, el micromotor (31) de los medios de desplazamiento (3) está concebido para inculcar una rotación de 10 grados cada 2,5 segundos al cartucho (1) (es decir, un ciclo de PCR en 1,5 min). Sin embargo, en otros modos de realización, este movimiento podrá presentar una velocidad diferente y ser continuo en lugar de ser discontinuo.

10 Nótese que el dispositivo óptico (5) está previsto por encima del bloque correspondiente 23 calentado a una temperatura correspondiente a la temperatura de elongación, y más particularmente, a un emplazamiento que se corresponde con el final de la fase de elongación. Por supuesto, el dispositivo óptico (5) puede situarse en un emplazamiento diferente, elegido principalmente en función de la química utilizada. Por ejemplo, utilizando la química TaqMan™ o fluorescencia no específica, es lógico efectuar la medición al final de la fase de elongación, como se ha descrito anteriormente. Sin embargo, la utilización de una química del tipo Molecular Beacons™ implica que la medición se haga más bien en el momento de la hibridación.

15 El sistema presentado permite llenar rápidamente y de manera reproducible una gran cantidad de cámaras de reacción y efectuar sobre su contenido una PCR y mediciones de la fluorescencia en cada ciclo de la PCR.

El modo de realización descrito en esta memoria no tiene por objeto reducir el alcance de la invención. Por lo tanto, se podrán aportar numerosas modificaciones sin salir de su marco.

Ejemplo 2: Cartucho circular mejorado

20 Las figuras 5 a 10 representan un ejemplo de cartucho circular que presenta ciertas modificaciones con respecto al cartucho del ejemplo 1.

Este cartucho está previsto para una utilización en un sistema cerrado, es decir que las cámaras de reacción (13) no tienen otra abertura más que la entrada del canal (12). El cartucho está constituido por dos elementos que encajan uno dentro del otro: la parte inferior, o base, está representada en las figuras 5 y 6, y la parte superior, o tapa, está representada en las figuras 7 y 8. El ensamblaje de las dos está ilustrado en las figuras 9 y 10.

25 La carga de este cartucho se efectúa de la manera siguiente:

30 El usuario sitúa en el depósito central el extracto de ácidos nucleicos que se va a analizar. Sitúa el consumible en el sistema automatizado. Este último crea una presión inferior en el interior del cartucho ($P = 0,05$ bar aproximadamente), por ejemplo, mediante el uso de una bomba (42). A continuación, la presión se restablece, lo que permite la entrada de los fluidos en los canales y llenar las cámaras de reacción periféricas. Así, con respecto al dispositivo del ejemplo 1, el fluido ya no se dirige por un aumento de la presión sino por presión inferior, lo que presenta la ventaja de no necesitar ventilación y, por lo tanto, trabajar en un sistema cerrado.

En su caso, se pueden prever distintos subdepósitos en lugar de un solo depósito, lo que presenta la ventaja de tratar simultáneamente varias muestras.

35 El fondo del depósito tiene una forma cónica que permite que el fluido se distribuya en su periferia, es decir cerca de la entrada de los canales.

40 La unión entre los canales y el depósito, se encuentra un sistema anti-reflujo, constituido por una porción de canal vertical (123), lo que, por una parte, evita las contaminaciones cruzadas en caso de un retorno accidental del fluido hacia la parte central o en caso de que todo el fluido no se hubiera dirigido al canal y, por otra parte, permite una vez el direccionamiento efectuado pero antes de la PCR, para taponar los canales por medio de un tapón cuyos dientes casan con estas entradas verticales, con el fin de trabajar en un sistema cerrado (sin contaminación, sin evaporación).

El cartucho es de plástico, preferentemente de policarbonato ya que este polímero presenta características físicas, ópticas y de comportamiento térmico interesantes.

El tamaño de los canales es, por ejemplo, de 0,4 x 0,2 mm (medialuna) en la sección.

45 El tamaño del consumible es, por ejemplo, de 100 mm (diámetro), el número de cámaras es de 80, el número de subdepósitos está comprendido entre 1 y 8.

50 Tal y como se ilustra en la figura 10, el cartucho (1) presenta en la parte inferior una parte saliente central (181) que comprende una muesca (182) de modo que la parte saliente (181) encaja en la placa calefactora (2) y une el cartucho (1) con los medios de desplazamiento (3) a nivel de un taco o eje (32) puesto en movimiento por un micromotor (31). La parte saliente (181) permite por lo tanto por una parte, posicionar el cartucho con respecto a una placa (2) tal como la representada en la figura 2B, y por otra parte, asegurar su conexión con los medios de puesta en movimiento (3).

Las cámaras de reacción se cargan con cebadores específicos de las secuencias diana y, llegado el caso, con sondas de tipo TaqMan™ o cualquier otra de dichas dianas. Dependiendo de las aplicaciones, las dianas serán genes víricos o bacterianos, las uniones entre un transgén y el genoma de una planta para detectar y/o identificar ciertos OGM, etc.

- 5 Una variante del cartucho descrito anteriormente, que comprende 36 cámaras de reacción con un volumen de 8 µl y canales con un diámetro de 0,3 mm, ha sido utilizada para efectuar un ensayo de detección de la bacteria *Salmonella*. Se colocaron 288 µl (es decir 36 veces 8 µl) de la solución siguiente en el depósito central:

- 10 DUTP 400 µM
dNTP: 200 µM
Tampón Taq: 1 x
MgCl₂: 3 mM
Taq: 15 U
15 TWEEN (marca registrada): 0,007%
SybrGreen (marca registrada): 0,1 x
ADN genómico de *Salmonella enteritidis* (salmonella): 1 ng
H₂O: csc

Se depositaron 1,6 picomoles de los cebadores FinA1 y FinA2, descritos en Cohen, Mechanda y col. 1996 en las cámaras de reacción.

- 20 Este experimento dio resultados positivos, como se esperaba.

Bibliografía

- Cohen, H. J., S. M. Mechanda y col. (1996). "PCR amplification of the *fimA* gene sequence of *Salmonella typhimurium*, a specific method for detection of *Salmonella* spp." *Appl Environ Microbiol* **62**(12): 4303-8.
- 25 Gibson, U. E., C. A. Heid y col. (1996). "A novel method for real time quantitative RT-PCR." *Genome Res* **6**(10): 995-1001.
- Heid, C. A., J. Stevens y col. (1996). "Real time quantitative PCR." *Genome Res* **6**(10): 986-94.
- Williams, P. M., T. Giles y col. (1998). "Development and application of real-time quantitative PCR." En F; Ferré (compilador), *Gene Quantification*. Birkhäuser, Boston.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Dispositivo para efectuar reacciones enzimáticas y/o de biología molecular que requieren al menos dos temperaturas de incubación diferentes, que comprende al menos un cartucho (1) en forma circular que comprende varias cámaras de reacción (13), en las que se depositan previamente los cebadores, un depósito (11) y los canales (12), caracterizado porque:
- este cartucho (1) que posee una geometría de revolución, en el cual el depósito (11) está situado sensiblemente en el centro, las cámaras de reacción (13) que están repartidas en círculo alrededor de dicho depósito, y los canales (12) que unen dicho depósito (11) con dichas cámaras (13), los canales están previstos esencialmente de forma radial;
- 10 - al menos una placa calefactora (2) que presenta al menos dos zonas distintas que se pueden calentar al menos a dos temperaturas diferentes, en particular la placa calefactora que presenta tres zonas distintas que se pueden calentar a tres temperaturas diferentes;
- los medios (3) de desplazamiento relativo entre dicho cartucho y dicha placa, que permiten una variación cíclica de la temperatura de las cámaras de reacción.
- 15 2. Dispositivo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dichas cámaras de reacción (13) están previstas en la periferia de dicho cartucho.
3. Dispositivo de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que la reacción enzimática es una amplificación en cadena termo-dependiente de secuencias de ácidos nucleicos, y en el que las zonas de la placa calefactora (2) se pueden calentar al menos a dos temperaturas diferentes, que se corresponden con las fases de los ciclos de amplificación de dichos ácidos nucleicos.
- 20 4. Dispositivo de acuerdo con la reivindicación 3, caracterizado porque:
- los cebadores específicos de las secuencias diana que se van a amplificar se distribuyen previamente en las cámaras de reacción (13),
 - el depósito (11) está destinado a recibir un fluido compuesto principalmente por una muestra de ácidos nucleicos que se va a analizar y los reactivos necesarios para una reacción de amplificación en cadena con la polimerasa, con la excepción de los cebadores,
 - la placa calefactora (2) presenta tres zonas distintas que se pueden calentar a tres temperaturas distintas, que se corresponden con las tres fases de los ciclos de amplificación en cadena con la polimerasa.
- 25 5. Dispositivo de acuerdo con la reivindicación 3 o 4, para la amplificación en cadena termo-dependiente de secuencias de ácidos nucleicos medida en tiempo real, caracterizado porque comprende unos medios ópticos (5) de excitación/medición de la fluorescencia, dispuestos de manera que excitan y miden en cada ciclo la fluorescencia del contenido de las cámaras de reacción.
- 30 6. Dispositivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que las distintas zonas de calentamiento de la placa (2) están repartidas en al menos dos o tres porciones de disco.
- 35 7. Dispositivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que las distintas zonas de calentamiento de la placa (2) se reparten en las porciones de la corona.
8. Dispositivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dichos medios de desplazamiento (3) autorizan la rotación de dicho cartucho (1) y/o de dicha placa calefactora (2).
- 40 9. Dispositivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el cartucho (1) está en contacto directo con la placa calefactora (2).
10. Dispositivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde la placa (2) está provista de un revestimiento que favorece el desplazamiento relativo entre dicho cartucho (1) y dicha placa (2).
- 45 11. Dispositivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde dicha placa calefactora (2) comprende dos o tres termobloques distintos (21, 22, opcionalmente, 23) conectados a unos medios de programación de su temperatura.
12. Dispositivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que comprende unos medios ópticos (5) de excitación/medición de la fluorescencia dispuestos encima o a un lado del cartucho.
13. Dispositivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, que comprende además unos medios (4) que permiten conducir el fluido presente en el depósito (11) a las cámaras de reacción (13).
- 50 14. Dispositivo de acuerdo con la reivindicación 13, en el que dichos medios de conducción (4) incluyen un

dispositivo de pistón (41), y el fluido se conduce a las cámaras de reacción por un aumento de la presión.

15. Dispositivo de acuerdo con la reivindicación 13, en donde dichos medios de conducción (4) incluyen una bomba (41), y el fluido es conducido a las cámaras de reacción por un restablecimiento de la presión después de establecer una presión inferior.

5 16. Dispositivo de acuerdo con la reivindicación 5, en el que las cámaras de reacción (13) del cartucho (1) están cerradas.

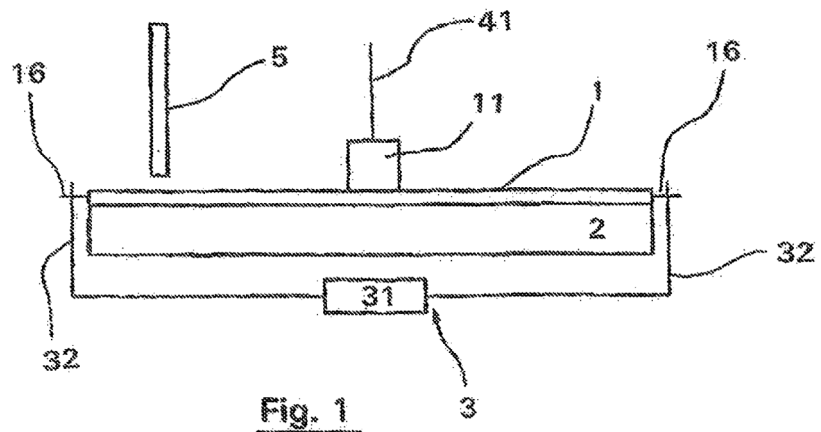
17. Procedimiento para la amplificación de ácido nucleico gracias a un dispositivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, que comprende las siguientes etapas:

10 - llenar al menos parcialmente el depósito (11) con un fluido que contiene una muestra de ácidos nucleicos que se va a analizar, así como todo lo necesario para una reacción de amplificación con la excepción de los cebadores y, en su caso, un agente intercalante fluorescente de los ácidos nucleicos;

- distribuir dicho fluido en las cámaras de reacción (13) del cartucho (1), en las que se han depositado previamente los cebadores y, en su caso, una o varias sondas marcadas;

15 - poner en marcha los medios (3) de desplazamiento relativo entre el cartucho y la placa calefactora para conducir sucesivamente y tantas veces como se quiera el contenido de cada cámara de reacción a dos, tres o más temperaturas definidas por las dos, tres o más zonas de dicha placa calefactora (2).

18. Procedimiento para la amplificación de acuerdo con la reivindicación 17, en el que la etapa de distribución del fluido en las cámaras de reacción (13) se efectúa aplicando una presión inferior en el interior del cartucho, restableciendo a continuación la presión.



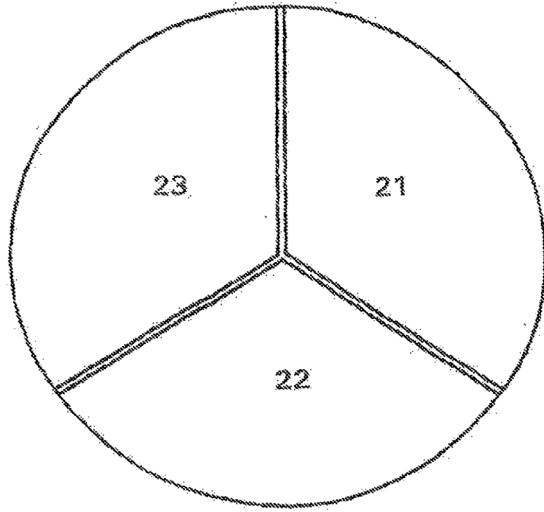


Fig. 2 A

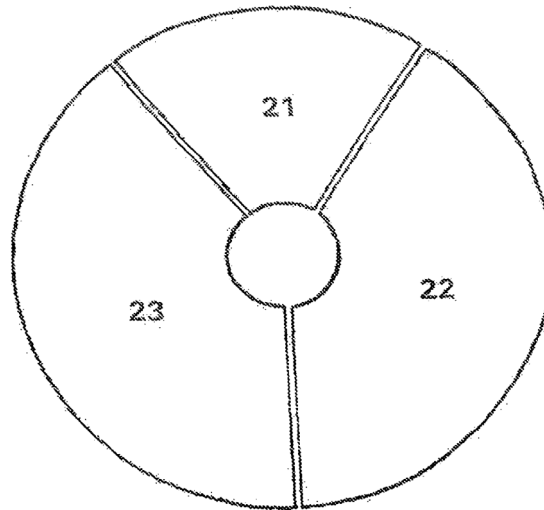


Fig. 2B

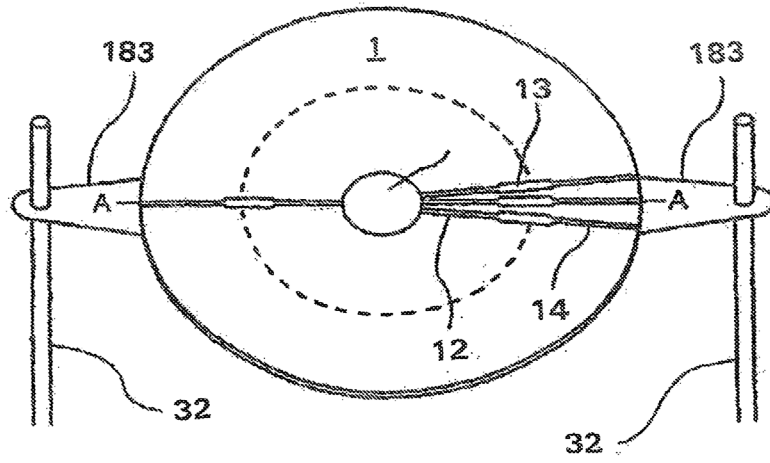


Fig. 3

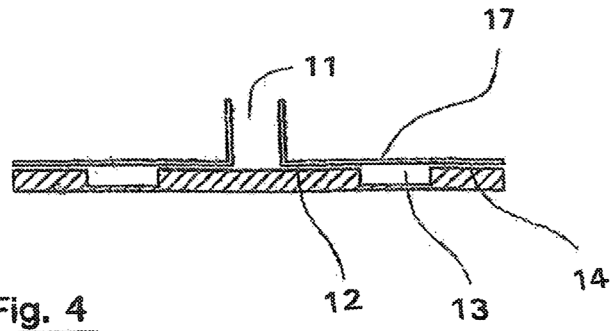


Fig. 4

CARTUCHO INFERIOR
ESCALA 2.000

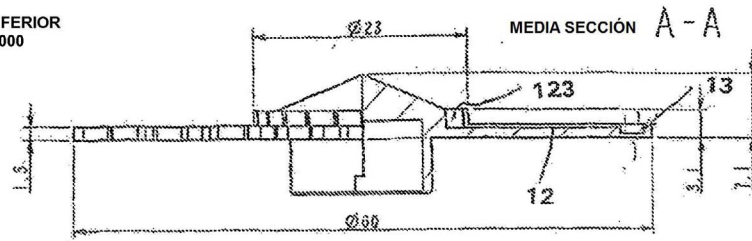


Fig. 6

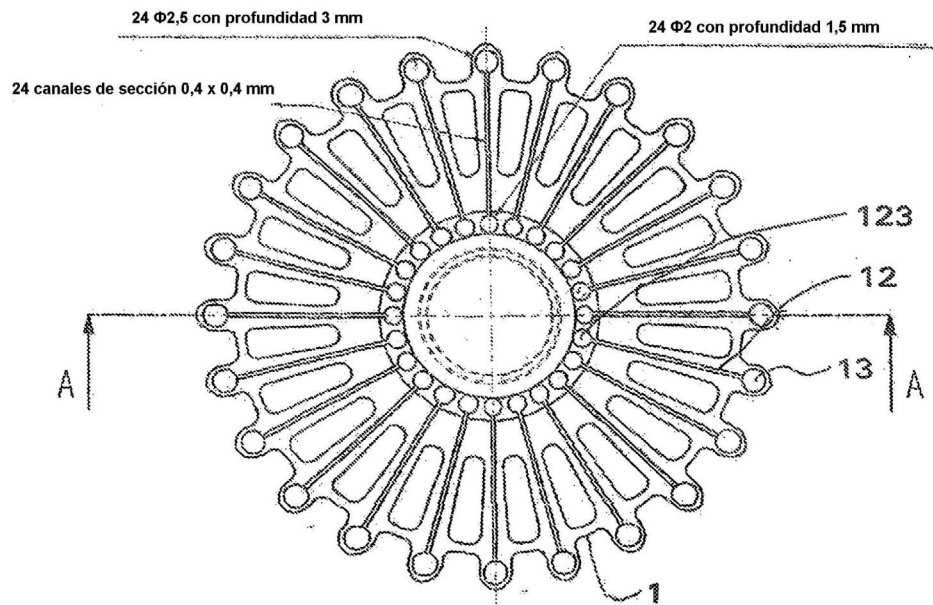


Fig. 5

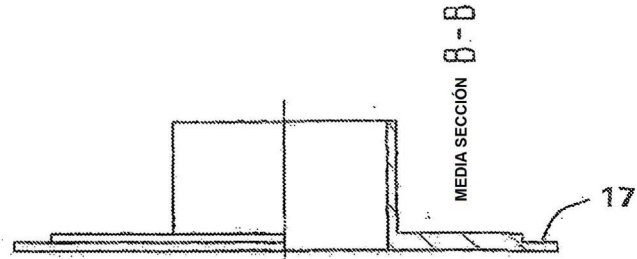


Fig. 8

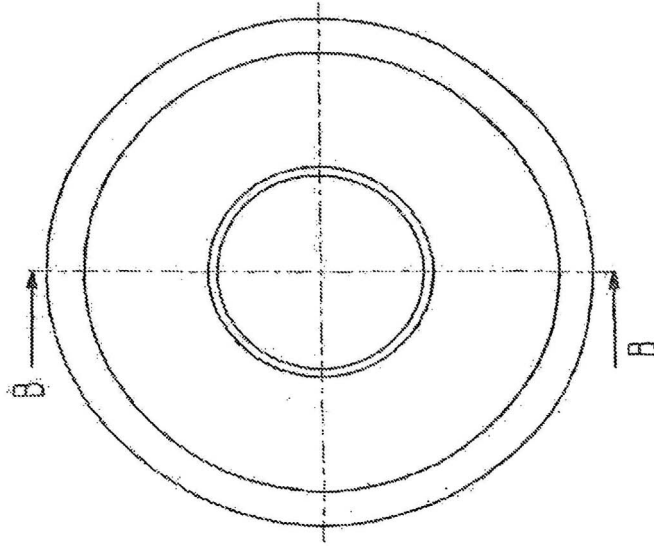


Fig. 7

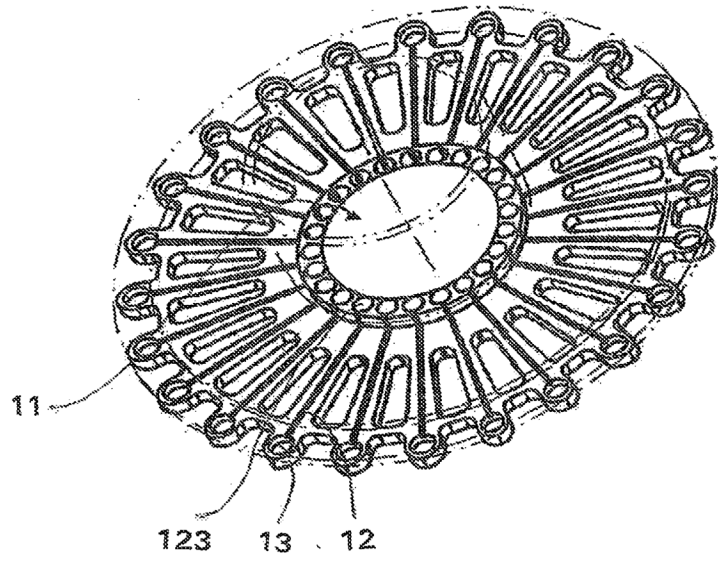


Fig. 9

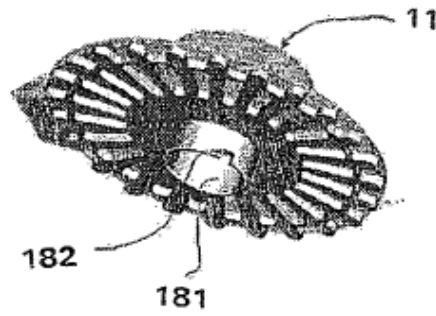
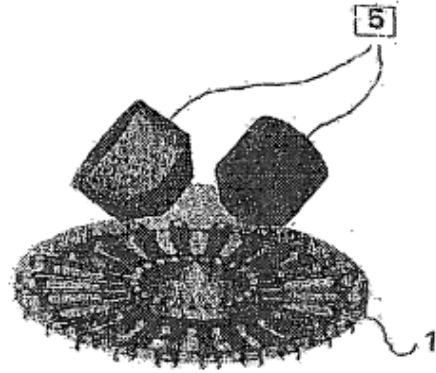


Fig. 10

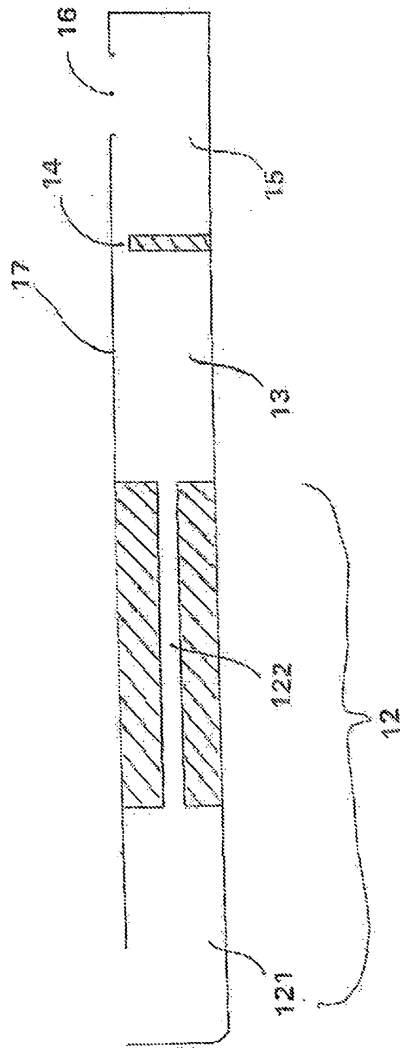


Fig. 11