(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 505 331**

(51) Int. CI.:

G01N 21/03 (2006.01)
B01L 3/00 (2006.01)
B01J 19/00 (2006.01)
B01L 7/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.03.1998 E 10181334 (3)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.06.2014 EP 2333520**

(54) Título: **Montaje para reacción química con intercambio de calor e interrogación óptica**

(30) Prioridad:

28.02.1997 US 808325
28.02.1997 US 808327
28.02.1997 US 808733

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.10.2014

(73) Titular/es:

CEPHEID (100.0%)
904 Caribbean Drive
Sunnyvale, CA 94089, US

(72) Inventor/es:

CHANG, RONALD;
CHRISTEL, LEE A.;
KOVACS, GREGORY T. A.;
MCMILLAN, WILLIAM A.;
NORTHRUP, M. ALLEN;
PETERSEN, KURT E.;
POURAHMADI, FARZAD;
YOUNG, STEVEN J. y
YUAN, ROBERT

(74) Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

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

DESCRIPCIÓN

Montaje para reacción química con intercambio de calor e interrogación óptica

Campo de la invención

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

Antecedentes de la invención

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

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

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

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

Parte del por qué del bloque de metal de tamaño relativamente grande estriba en proporcionar una masa suficiente para asegurar una temperatura constante y uniforme en cada sitio de reacción, así como de sitio a sitio. Algunos instrumentos de reacción de transferencia de calor incorporan, así mismo, una placa superior, la cual es enfriada y calentada para asegurar una temperatura uniforme a través de la parte superior de todas las soluciones de muestra. Los insertos de muestra son ahusados para potenciar al máximo el contacto térmico entre el inserto y el bloque de metal. Un problema de este sistema es que las grandes masas térmicas que se requieren con vistas a la uniformidad de la temperatura, necesitan un largo periodo de tiempo (y o una fuente de potencia de calentamiento / enfriamiento de gran tamaño) para calentar y enfriar. La velocidad habitual de calentamiento y enfriamiento para este tipo de instrumentos es del orden de 1 a 3 ºC / segundo.

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

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

Otro elemento fundamental de las muchas reacciones químicas es la supervisión del proceso químico y la detección del producto resultante. La supervisión en tiempo real del proceso a medida que se produce, hace posible la obtención de datos precisos y cuantitativos para determinar el avance de la reacción, y del ajuste en consonancia de los parámetros de calentamiento / enfriamiento. Cuando se dirigen múltiples ciclos, los procesos pueden ser supervisados después de cada ciclo térmico. Después de que la reacción se ha completado, el producto debe ser determinado. En algunos procesos, el producto es separado antes de la detección.

Una técnica de detección preferente para el análisis es la interrogación óptica típicamente utilizando fluorescencia, fotosíntesis o quimioluminiscencia. Para ensayos de aglutinación de ligantes, a menudo son utilizadas la fluorescencia de resolución en el tiempo y la polimerización de la fluorescencia. Se puede alcanzar una sensibilidad óptica óptima en soluciones fluidas maximizando la longitud de trayectoria de muestreo óptica tanto de los haces de luz que excitan las moléculas quñimicas como la luz emitida que será detectada para generar la señal óptica.

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

Dispositivos convencionales para el control de las reacciones mediadas por enzimas

Los dispositivos que controlan la transferencia de calor para las reacciones químicas son aplicables en las reacciones de síntesis, como por ejemplo la PCR de ciclado térmico para amplificar un segmento nucleico. En esta técnica, una plantilla de ADN es utilizada con una polimerasa de ADN termoestable, por ejemplo la polimerasa de ADN Taq, trifosfatos nucleósidos, y dos oligonucleótidos con diferentes secuencias, complementarias a las secuencias que están situadas en las cadenas opuestas de la plantilla de ADN y que flanquean el segmento de ADN que debe ser amplificado (“cebadores”). Los componentes de reacción son sometidos a ciclo entre una temperatura más alta (por ejemplo, 95 ºC) para la deshibridación de la plantilla bicatenaria del ADN, seguido por temperaturas más bajas (de 40 a 60 ºC para el recocido de los cebadores y de 70 a 75 ºC para la polimerización). El sometimiento repetido a ciclos entre las temperaturas de deshibridición, hibridación y polimerización proporciona una amplificación exponencial de la plantilla de ADN. Por ejemplo hasta 1 µg de ADN diana hasta 2kb de longitud puede obtenerse con 30-35 ciclos de amplificación de solo 10^{-6} µg de ADN de partida.

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

Parte de la instrumentación apropiada para procedimientos más novedosos, que requieren análisis óptico en „tiempo real“ después de cada ciclo térmico solo en los últimos tiempos está disponible. Por ejemplo, el instrumento Perkin Elmer (PE) 7700 ATC así como el termociclador PE 9600 están basado en un formato de bloque de aluminio de 96 pocillos, como se ha descrito anteriormente, y de este modo están limitados por las etapas de calentamiento y enfriaiento lento y ópticas complicadas. La detección de fluorescencia óptica en el PE 7700 se lleva a cabo guiando una fibra óptica en cada uno de los noventa y seis sitios de reacción. Un láser central de gran potencia excita secuencialmente cada tubo de reacción y captura la señal de fluorescencia a través de la fibra óptica. Puesto de todos los sitios de reacción son excitados secuencialmente por un único láser y que la fluorescencia es detectada

por un único tubo espectrómetro y fotomultiplicador se requieren un guiado de haces complejo y una multiplexación óptica.

Un instrumento de Idaho Technologies supervisa cada tubo de reacción en secuencia a medida que portadores de muestras capilares giran pasando por sitios de calentamiento y de enfriamiento y sitios de interrogación óptica. Este instrumento es mucho más simple que el ATC, sin embargo, no se configura fácilmente para aplicaciones de comerciales de diagnóstico de PCR de alto rendimiento.

Un tercer sistema de análisis de la PCR en tiempo real, es el dispositivo MATCI desarrollado por el Dr. Allen Northurp et al., tal y como se divulga en la Patente estadounidense No. 5,589,136, incorporada en la presente memoria por referencia. Este dispositivo utiliza una técnica modular para el sometimiento térmico a ciclo de la PCR y para el análisis. Cada reacción se lleva a cabo dentro de su propio manguito térmico de silicio y cada manguito incorpora su propia fuente de excitación óptica asociada y un detector de la fluorescencia. Mediante el uso de una nueva generación de LEDs azules, ópticas imples y detectores en estado sólido se pueden obtener datos en tiempo real a partir de un módulo compacto de baja potencia. No solo las ópticas son siples y eficientes, sino que la baja masa térmica sometido a ciclo térmico hace posible que el dispositivo MATCI desarrolle unas velocidades de calentamiento y enfriamiento extremádamente rápidas, de calentamiento de hasta 30 ºC / seg y de enfriamiento de 5 ºC / seg.

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

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

Sumario de la invención

Se proporciona un conjunto para controlar y llevar a cabo reacciones químicas de intercambio de calor. El conjunto está diseñado para una transferencia térmica óptima a o desde una muestra y una visualización óptica eficiente de una reacción química con la muestra.

El conjunto tiene una cámara de intercambio de calor para recibir una muestra. La cámara tiene una carcasa que comprende un soporte rígido, un depósito que está adaptado para recibir la muestra; y una estructura flexible delgada que define al menos una porción del depósito y acoplada a dicho soporte rígido. La estructura flexible se puede conformarse a la superficie de un elemento de calentamiento externo para contactar la superficie del elemento de calentamiento externo para una óptima conducción térmica. Se encuentra presente un orificio que puede sellarse para introducir la muestra en el depósito.

En otra realización de la cámara química, dos caras principales opuestas están unidas por una pluralidad de caras secundarias contiguas para formar una cámara cerrada en la que la relación de la conductancia térmica de las caras principales respecto de las caras secundarias es al menos de aproximadamente 2:1. Dos de las caras secundarias están desviadas formando un ángulo y están adaptadas para transmitir luz. La cámara incluye un orificio para introducir una muestra en dicha cámara y una junta.

El conjunto incluye, además, un manguito térmico que tiene una ranura para introducir un recipiente de muestra, tal como el recipiente de intercambio de calor, dentro del manguito, un elemento de calentamiento integrado con una pared del manguito, una superficie de contacto en la pared para apoyar con una porción del recipiente de muestra, donde el recipiente está presente; y una conexión eléctrica para aplicar corriente al elemento de calentamiento.

Además del manguito térmico, pueden estar presentes en la pared del manguito elementos de empuje para presionar la superficie de contacto contra una porción del recipiente de muestra. En una realización, las paredes son placas paralelas opuestas y el recipiente de muestra está colocado entre las placas.

Además, se proporciona un instrumento para controlar los cambios de temperatura de una muestra y visualizar la carcasa. El instrumento tiene una carcasa que comprende una conexión eléctrica, una fuente de enfriamiento, una zona de procesamiento adaptada para recibir un manguito térmico, y un montaje de elementos ópticos en comunicación óptica con el manguito, donde, el manguito está insertado dentro del conjunto; y una placa de circuito impreso para controlar el montaje de elementos ópticos y para recoger la señal de salida del conjunto de elementos ópticos.

Preferentemente, hay una pluralidad de carcasas y módulos asociados posicionados sobre un soporte, cada uno de los cuales puede ser controlado independientemente para calentar y/o enfriar. Una tarjeta controladora supervisa y controla el intercambio de calor y recoge y analiza datos.

La patente de los Estados Unidos 4 810 653 divulga un aparato como el definido en el preámbulo de la reivindicación independiente 1.

Breve descripción de los dibujos

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

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

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

Las Figuras 4a, b, c, d muestran diversas vistas esquemáticas en perspectiva de otra cámara de reacción química de acuerdo con la presente invención con unas caras principales y secundarias en ángulo para optimizar la visualización óptica, en las que la Figura 4a muestra una vista lateral de la cámara, la Figura 4b muestra una vista frontal del interior de la cámara de reacción química con un canal para muestras que comunica con el depósito, la Figura 4d muestra una vista superior de la cámara.

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

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

La Figura 7 muestra otra vista en perspectiva de otro montaje de intercambio de calor con una cámara insertada en un manguito térmico.

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

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

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

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

Descripción detallada de la invención

En general, la presente invención proporciona un montaje de calentamiento y enfriamiento mecánico de masa térmica reducida el cual está adaptado para el rápido calentamiento y enfriamiento de soluciones químicas para llevar a cabo unas reacciones y para la detección eficiente de los productos de la reacción. La baja masa térmica del sistema asegura el rápido calentamiento y enfriamiento, dado que hay poco material que calentar y enfriar y porque hay una alta relación de la superficie con respecto al volumen para la transferencia térmica. El experto en la técnica solo ha apreciado recientemente que el rápido calentamiento y enfriamiento mejora la eficiencia y reduce la cantidad de reacciones extrañas no deseables y que determinadas reacciones pueden llevarse a cabo con unas velocidades elevadas de intercambio térmico. Sin embargo, ningún dispositivo ha sido capaz de un intercambio térmico eficiente e independiente así como de detección de cada una de las unidades de dispositivo hasta la presente invención.

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

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

Cámara de intercambio de calor

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

Detallando más los componentes mostrados en la realización a modo de ejemplo en la Fig. 1, una cámara química (2) presenta un orificio (4) que está en comunicación fluida con una carcasa (6) que tiene un canal (8) que conecta el orificio con un depósito (10). Un capuchón de cierre (12) está fijado a la carcasa (6) mediante un brazo flexible (14) y está adaptado para cubrir el orificio (4) que lo cierra herméticamente. El capuchón (12) puede ser insertado dentro del orificio (4) para encajar con el canal (8). Un bastidor de soporte rígido (16) y unas paredes flexibles delgadas (18), mostradas en la Fig. 1 en despiece ordenado desde la cámara, definen ambos el depósito (10), en el que las paredes flexibles están acopladas al bastidor. Sobre el soporte rígido se encuentran unas caras reflectantes (20) que hacen rebotar la luz trasmitida desde el depósito, haciendo posible una detección incrementada de la señal.

En la utilización de la cámara, una muestra añadida al orificio (4) fluye a través del canal (8) y en el depósito (10). En el depósito (10), la muestra es introducida en las sustancias químicas para reaccionar. Las paredes del depósito son forzadas a ejercer presión contra los elementos de enfriamiento y calentamiento. Preferentemente, las paredes se adaptan a la superficie del elemento. La muestra queda expuesta a las variaciones de la temperatura mediante la activación del elemento de calentamiento / enfriamiento. Los productos de la reacción y /o la reacción son visualizados ópticamente.

La estructura delgada flexible (18),que define al menos una porción del depósito facilita la conductancia térmica óptima a las sustancias químicas contenidas en el depósito. La naturaleza flexible de las paredes (18) permite el máximo contacto con una fuente de calentamiento o enfriamiento. La pared es típicamente adaptable a la superficie de un elemento térmico externo, de tal manera que la superficie de la estructura flexible puede adaptarse a la forma de la superficie del elemento de calentamiento / enfriamiento externo de una manera que evite o reduzca al mínimo los espacios libres entre las dos superficies. Así mismo, la pared flexible continúa adaptándose a la superficie térmica cuando la forma de la superficie pueda cambiar en el curso de la operación de intercambio de calor. Por ejemplo cuando el elemento de calentamiento se expanda debido al aumento de la temperatura, la pared de la cámara se expandirá también para mantener el contacto óptimo con el elemento de calentamiento. Asi mismo, si las paredes se expanden debido a un incremento de la presión interna, producida dentro del depósito, las paredes no se hacen rígidas sino que permanecen conformadas a la superficie de calentamiento o enfriamiento. El contacto puede efectuarse haciendo presionar la fuente térmica contra las paredes y / o mediante la presión de las paredes contra la superficie térmica.

Las Figs. 2a y 2b demuestran el contacto que un depósito químico efectúa con un manguito térmico para formar un módulo de intercambio de calor (30). En la Fig. 2a, el manguito térmico (32) con placas de calentamiento o enfriamiento (36), (38), están en posición relajada con una abertura (34) entre las placas. Sin embargo, tal y como se representa en la Flg. 2b, cuando la cámara (46) con las paredes flexibles (48) es insertada en la abertura entre las dos placas (36), (38) de calentamiento o enfriamiento en ángulo, las superficies (40), (42) de las placas encajan completamente con las paredes (48) de la cámara. En esta posición activada, existe poco o ningún espacio libre entre las superficies de las placas y las paredes de la cámara. Las placas (36),(38) están dispuestas para presionar contra las paredes (48) mediante unos muelles (44). Como alternativa, las paredes de las cámaras están dispuestas para presionar contra las placas térmicas. Las paredes conformables de la cámara se moldean de acuerdo con la configuración en ángulo de la superficie de calentamiento para proporcionar el máximo contacto térmico entre las superficies.

Además de la capacidad de la cámara para potenciar al máximo la cinética térmica, la pared flexible presentan una baja masa térmica para permitir la rápida transferencia de calor. Las paredes delgadas de la cámara también promueven la transferencia tanto de temperaturas calientes como frías al depósito. En la Fig. 3 se muestra una vista desde arriba de una cámara de reacción (50), quel está en íntimo contacto con los elementos de calentamiento (52) y está rodeado por la cámara de enfriamiento (54). El grosor de la estructura de pared es de 0,000254 cm y 0,0508 cm, normalmente aproximadamente 0,00127 cm y 0,0127 cm y, preferentemente, aproximadamente 0,00254 cm y 0,00762 cm. Con el fin de conseguir esta finura, la pared puede ser una película, una hoja, o una pieza extruida o fundida, mecanizada, moldeada u otra estructura delgada y flexible pertinente.

El material que compone la pared puede ser un polialcohol incluyendo polipropileno, polietileno, poliéster, y otros polímeros, polímeros laminados u homogéneos, metales o laminados metálicos, u otros materiales que puedan ser delgados flexibles, portables y que permitan una gran transferencia de calor y, de modo preferente, se presenten bajo la forma de una de película u hoja. Cuando el bastidor de la cámara que soporta las paredes esté hecho de un material específico, como por ejemplo polipropileno, las paredes son, de modo preferente, de los mismos materiales, como por ejemplo polipropileno, para que las velocidades de expansión y enfriamiento de las paredes sean las mismas que las el bastidor. Por consiguiente, se reducen al mínimo los esfuerzos indebidos inducidos por el calor o el enfriamiento sobre los materiales, de tal manera que las paredes del manguito mantengan el mismo contacto con el bastidor evitándose la formación de arrugas en las paredes durante múltiples sometimientos a ciclos de temperatura.

Aunque las paredes flexibles son preferidas, en algunas formas de realización, las paredes que contactan con los elementos de calentamiento pueden, así mismo, ser rígidas y planas para comunicar con un calentador rígido y plano. Ya sean rígidas o flexibles, las paredes típicamente constituyen las caras principales de la cámara para posibilitar la máxima exposición al calor o al enfriamiento de las sustancias químicas contenidas en su interior. La cámara, así mismo, presenta una cara secundaria en una pluralidad de caras secundarias que proporcionan un bastidor o soporte de las caras principales.

Las caras principales y secundarias de una cámara cerrada herméticamente se muestran a lo largo de las Figs. 4a, b, c, d con caras principales y secundarias een ángulo para potenciar al máximo la visualización óptica. Una pluralidad de caras secundarias , dos de las cuales se muestran en la figura 4a , las caras secundarias (62), (64) se acoplan a dos caras principales opuestas (72), (74) (solo se muestra una cara principal) juntas para formar la cámara (60).Ilustrada en la figura 4b, una cara principal (74) puede estar rodeada por cinco caras secundarias contiguas (62), (64), (66), (68).(70).

Enla figura 4b, las caras secundarias en ángulo (64), (66) están acopladas entre sí formando un ángulo en un extremo y a caras secundarias paralelas (62), (68) en el otro. Las caras en ángulo (64), (66) pueden delimitar la porción de fondo del depósito (76), y una pared posterior (78) puede delimitar la porción superior del depósito (76) como se representa en la vista interior de una cámara en la figura 4c, enla que un cánal para uestras (80) conduce al depósito (76). El canal y el depósito que incluyen las paredes traseras pueden, de modo opcional, constituir una pieza separada insertada dentro del cuerpo principal de la cámara. El canal que conduce al depósito puede desempeñar una diversidad de funciones incluyendo un conducto para el llenado del depósito, por ejemplo, un llenado del fondo o un área para mantener llenos a rebosar los reactivos y purgado el aire.

Las carass en ángulo(64),(66) pueden estar unidas para formar un punto con forma de “V” (82) (triangular), especialmente sobre el fondo de la cámara para posibilitar un llenado más fácil mediante la reducción o eliminación de la formación de burbujas. Como alternativa, la superficie de contacto de las caras en ángulo no necesitan conectar para formar un punto, pero pueden estar separadas por una porción intermedia, como por ejemplo otra cara secundaria o diversos elementos característicos mecánicos o fluídicos que no interfieran de modo significativo con las prestaciones térmicas y ópticas de la cámara. Por ejemplo, las caras en ángulo pueden confluir en un orificio que conduzca a otro área de tratamiento en comunicación con la cámara de reacción, como por ejemplo un área de electroforesis capilar integrada.

La cara secundaria superior (70) está acoplada a los extremos de las caras paralelas (62), (68) en una realización mostrada a partir de la vista superior en la figura 4d. La cara superior (70) también está en contacto con un orificio (no mostrado) para añadir líquidos y retirar aire. El orificio posibilita el acceso de una punta de pipeta a través del

canal desde el exterior al interior de la cámara, por ejemplo, hasta el fondo del depósito, para posibilitar el llenado de abajo arriba. El orificio puede, así mismo permitir otros procedimientos convencionales de introducción de muestras, como por ejemplo por medio de un sistema de inyección de fluido automático o por medio de un colector fluidíco que, de modo opcional, forme parte integrante de la cámara. La cámara puede, así mismo, ser un aspecto de un dispositivo mayor que someta a tratamiento el fluido antes de que el fluido fluya a través del orificio y penetre en la cámara. Un ejemplo de un cartucho fluidíco desechable, se divulga en la solicitud de Patente estadounidense en tramitación con la presente con el número de serie 08/998,188 depositada el 24 de diciembre de 1997, cuya divulgación se incorpora por referencia en la presente memoria

El extremo externo del orificio está diseñado para ser cerrado de forma hermética, de modo preferente, mediante la recepción de un capuchón de cierre (84), en el que se muestra también una realización en la Fig. 4d. El capuchón 84 proporciona un medio para cerrar herméticamente el orificio después de su llenado para proporcionar una barrera entre el volumen de reacción interior térmicamente controlado y el entorno no controlado térmicamente para impedir la contaminación de la muestra, para impedir la evaporación de fluido durante el calentamiento de la muestra, y efectos similares. En diversas formas de realización anticipadas por la presente invención, el capuchón puede ser un capuchón de ajuste rápido, una tapa roscada, u otro cierre especial que se necesite para el protocolo analítico seleccionado. Dicho capuchón puede estar compuesto por cualquier material oportuno, como por ejemplo polipropileno o un elastómero, como por ejemplo Santopreno™ (marca de Monsanto Corporation, ubicada en San Lous, Missouri). En una forma de realización, la cámara puede quedar, así mismo, cerrada herméticamente desde el entorno exterior mediante el calentamiento del material plástico aplicado sobre o que componga la cara secundaria superior. En otra forma de realización, la junta estanca se crea mediante una gota de aceite situada sobre la parte superior de la muestra acuosa para impedir la evaporación de la muestra. Un capuchón de cierre puede también ser untapón que se inserta en un canal en comunicación con el depósito de manera que el tapón cree un aumento de presión dentro del depósito. La presiónaumentada puede permitir una solución en el depósito para que permanezca en estado líquido sin derivar a un estado gaseoso a unas determinadas temperaturas elevadas. Esta propiedad es acorde con el principio teórico PV = nRT, donde P es la presión, V es el volumen, n es el número de moles, R es una constante y T es la temperatura. La presión aumentada resultante puede también causar la expansión hacia el exterior de las paredes flexibles para frozar las paredes contra las unidades de calentamiento externas creando un mejor contacto entre las paredes y los elementos de calentamiento.

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

La Fig. 5 muestra una cámara (90) asociada con un sistema óptico (92) externo. El sistema óptico (92) asociado está diseñado para iluminar una cara óptica secundaria (94), (96) con una radiación de excitación óptica procedente de la fuente de luz individual (98) y para detectar la luz emitida desde el contenido del depósito y a través de la cara óptica secundaria adyacente con el detector (102). Como alternativa, ambas caras secundarias adyacentes (94), (96) pueden recibir radiación desde unas fuentes de luz (98), (100) y observación mediante los detectores (102), (104) está en la cara adyacente respectiva, donde la luz de excitación que es irradiada a través de cada cara tiene una longitud de ondas diferente y la luz detectada en cada pared tiene, así mismo, una longitud de ondas diferente. Trayectorias a modo de ejemplo de longitudes de ondas diferentes de la luz de excitación y detección se muestran mediante las flechas de la Fig. 5. Las caras (94), (96) incorporar adicionalmente dos lentes (106) directamente moldeadas dentro de la superficie para dirigir la luz.

Cuando la excitación y detección se produce en caras diferentes, como en la Fig. 5, en general es preferente que las caras ópticas estén descentradas en un ángulo (A). El ángulo preferente es de aproximadamente 90º. Un ángulo de 90º entre las trayectorias ópticas de excitación y detección asegura que una mínima cantidad de radiación de excitación que entra a través de la cara secundaria salga a través de otra cara secundaria de detección. Así mismo, el ángulo de 90º permite que una cantidad máxima de radiación emitida, por ejemplo de fluorescencia, sea recogida a través de la ventana de detección. En otras formas de realización, el ángulo existente entre las paredes ópticas existentes es mayor o menor de 90º dependiendo, *inter alia*, de la eficiencia y la sensibilidad de los elementos ópticos de excitación y detección. Por ejemplo, cuando un sistema de detección discrimine de manera eficaz entre la luz de excitación y la emitida, puede desearse un único ángulo de 90º entre las paredes. Por el contrario, cuando un sistema de detección no consigue discriminar de manera eficaz entre la luz de excitación y la emitida, puede resultar de interés un ángulo mayor de 90º.

Uno o más elementos transmisores de luz pueden estar presentes sobre las caras secundarias que forman un ángulo. Los elementos ópticos pueden estar diseñados, por ejemplo, para potenciar al máximo el volumen total de la solución que es iluminada por una fuente de excitación de fluorecencia de LED, para enfocar una fuente de excitación óptica sobre una zona específica de la cámara de reacción, o para recoger la mayor señal posible de

fluorescencia de la mayor fracción posible del volumen de la cámara de reacción. Así mismo, pueden ser utilizadas rejillas para seleccionar longitudes de ondas específicas, filtros para hacer posible que solo determinadas longitudes de onda pasen, y múltiples lentes o filtros potenciados al máximo para fuentes de excitación o detectores múltiples. En otra forma de realización, la cara opuesta puede potenciarse al máximo para recoger y enfocar el porcentaje máximo de la señal de fluorescencia emitida desde la solución hasta un conjunto de fotodetectores. Como alternativa, las caras ópticas pueden ser ventanas simples, transparentes, planas que sirvan como ventanas ópticamente transmisivas. Otros elementos incluyen lentes coloreadas para proporcionar funciones de filtrado, superficies retrorreflectantes, superficies de rejillas ópticas, etc.

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

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

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

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

El un procedimiento de fabricación de una cámara donde las caras principales y secundarias son de materiales diferentes, las caras secundarias del bastidor son moldeadas con un depósito que tiene lados abiertos. El bastidor rígido de cámara se realiza con procesos de moldeo por inyección estándar para materiales térmicos. Después de fabricar el bastidor, las paredes principales son fabricadas colocando y, de modo preferente, estirando el material sobre el área del depósito. Las paredes son entonces unidas al bastidor. Cuando las paredes son una película o una hoja, el material puede ser fijado mediante termosellado, unión por adhesivo, unión ultrasónica, etc., al depósito de la cámara.

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

combinación de éstos. Se prefieren los policarbonatos para las caras ópticamente transparentes.

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

La forma de la cámara puede diferir de acuerdo con la reacción concreta que se está llevando a cabo y con el dispositivo de transferencia térmica asociado. Así mismo, la relación del bastidor con las paredes flexibles puede variar en tanto en cuanto el bastidor esté acoplado a las paredes y las paredes sean accesibles al contacto de una fuente térmica externa. Por ejemplo las caras secundarias pueden rodear el perímetro de las caras principales, como se ha descrito anteriormente en las figuras 4a-d. En la alternativa, las caras secundarias pueden proporcionar un bastidor de caja que soporta una bolsa centalmente suspendida que comprende las caras principales flexibles. La cámara puede tener el tamaño, en particular en la región del depósito de la cámara para contener volúmenes de nanolitros hasta mililitros, dependiendo del uso deseado. El volumen de la cámara oscila, de modo preferente, entre 1 y 1000 microlitros, y normalmente entre 1 y 500 microlitros y, como máxima preferencia, entre 10 y 100 microlitros.

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

Manguito térmico

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

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

La Fig. 7 demuestra cómo una cámara (252) puede ser encerrada en una realización del manguito térmico (200) representado en la figura 6, para formar un módulo de intercambio de calor (250). La superficie de contacto (208) de cada placa (202), (204) es forzada a ser presionada contra la superficie de la cámara (nomostrada) de una manera que potencie al máximo el contacto térmico. En general, el manguito puede consistir en una o más, y preferiblemente dos placas calentadoras separadas cargadas por muelle configuradas para presionar mecánicamente contra la superficie, por ejemplo el área del superficie, de la cámara de reacción. Dicha configuración cargada por muelle tiene por finalidad simplificar las tolerancias mecánicas entre los diferentes componentes mecánicos, esto es, el manguito térmico, la cámara y la unidad óptica. Como alternativa, las placas pueden fabricarse para que presionen contra la superficie de la cámara de reacción mediante una fuerza mecánica iniciada por otras partes o por un motor mecánico, por expansión térmica, o por presión neumática, como por ejemplo una presión por flujo de aire, una presión hidráulica y similares. El interior del manguito de intercambio de calor puede, así mismo, estar ahusado para permitir el ajuste sin huelgo con el inserto de la cámara de reacción. Así mismo, las paredes de la cámara insertada se pueden expandir para presionar también contra las superficies de la placa calentadora.

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

De acuerdo con lo descrito en la presente solicitud, la consecución de un rápido intercambio de calor (calentamiento y/o enfriamiento) a partir de una muestra en un tubo de reacción requiere un montaje de manguito térmico con una masa térmica reducida junto con un tuboe de reacción ancho, delgado. Los instrumentos más rápidos de sometimiento a ciclos térmicos hasta la fecha (por ejemplo el Light Cycler de Idaho Technologies y el MATCI de Lawrence Livermore National Labs) resuelven este problema haciendo que el tubo de reacción sea un cilindro delgado largo, con un diámetro de 1 mm o menos. Otros instrumentos de sometimiento a ciclos rápidos dependen de volúmenes de muestras líquidas muy pequeños, los cuales son relativamente fáciles de calentar y enfriar con rapidez. Sin embargo, estos sistemas son solo adecuados para volúmenes de muestras muy pequeños (tanto el Light Cycler como el MATCI están diseñado para solamente 10-20 µl) . Frente a ello, el tubo descrito en la presente memoria es delgado y ancho, en lugar de incrementar la capacidad del volumen simplemente haciendo que el tubo sea más largo, esta solicitud da a conocer que pueden, así mismo, conseguirse grandes velocidades de calentamiento y enfriamiento mediante unos tubos de reacción adecuadamente diseñados, los cuales son, respecto de los anteriores, delgados y anchos. El diseño de contrapartida y complementario del manguito térmico de masa reducida asegura que el montaje entero, incluyendo los volúmenes de muestras relativamente grandes (hasta y por encima de 100 µl), puede ser calentado de manera controlada y enfriada a las máximas velocidades.

Las placas térmicas pueden ser fabricadas de materiales diferentes. Con el fin de asegurar que el interior del manguito de intercambio de calor es resistente a la lejía y a otras soluciones de limpieza, el interior puede ser revestido o cubierto con un material químicamente inerte, como por ejemplo politetrafluoroetileno, o el entero manguito puede ser fabricado a partir de un material químicamente estable, como por ejemplo un material cerámico o metales, como por ejemplo nitruro de aluminio, óxido de aluminio, óxido de berilio, y nitruro de silicio. Otros materiales que pueden ser utilizados incluyen, por ejemplo, arseniuro de galio, silicio, nitruro de silicio, dióxido de silicio, cuarzo, vidrio, diamante, poliacrílicos, poliamidas, policarbonatos, poliésteres, poliimidas, polímeros de vinilo, y polímeros de vinilo halogenados, como por ejemplo politetrafluoroetilenos. Otros posibles materiales incluyen materiales termopar, como por ejemplo cromo-aluminio, superaleaciones, "*zyrcaloys*", aluminio, acero, oro, plata, cobre, tungsteno, molibdeno, tántalo, latón, zafiro, o cualquiera de los numerosos metales cerámicos, metales, y materiales poliméricos sintéticos disponibles en la técnica. Se prefiere una superficie interior de cerámica por que la superficie se puede mecanizar de manera convencional para tener una gran lisura para que tenga una gran resistencia al desgaste, una gran resistencia química, y un contacto térmico satisfactorio con los insertos de cámara de reacción. Las cáamaras de cerámica, pueden, asimismo, fabricarse muy delgadas (entre 0,025-0,050 mm) para una masa térmica reducida. Una cámara de intercambio de calor fabricada con aluminio o cobre presenta, asimismo, una elevada conducción térmica, pero una masa térmica mayor.

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

La función del puente de soporte mostrado en la forma de realización de la Fig. 6, y descrito con anterioridad, consiste en servir como soporte de uno o más elementos de calentamiento o enfriamiento del manguito térmico y para proporcionar una guía para la inserción de la cámara de reacción dentro del cuerpo principal del manguito térmico. El soporte puede incluir una hendidura para la inserción de la cámara entre las placas térmicas. La hendidura puede incorporar unos elementos característicos mecánicos o una superficie de estanqueidad que haga posible un cierre mecánico hermético.

Una circunstancia a tener en cuenta en la elección del material para el soporte es que el coeficiente de expansión térmica (TCE) coincida con el de las placas térmicas de la forma más estrecha posible. Los materiales de

construcción relacionados con anterioridad para la placa son también útiles para el soporte. Combinaciones apropiadas deben resultar evidentes al experto en la materia. Cuando las placas térmicas estánhechas de cerámica, el material preferido para la parte superior también es cerámica. Si la placa es de aluminio, el soporte será asimismo aluminio.

La transición mecánica entre la placa de manguito térmico y el soporte superior constituye una junta crítica. La placa de calentamiento o enfriamiento puede ser sometida a ciclo muchas veces (hasta 400.000 a lo largo de una vida de 5 años), por ejemplo, en aplicaciones de PCR entre aproximadamente la temperatura ambiente, 60 ºC, y 95 ºC, mientras el soporte superior puede ser mantenido a una temperatura relativamente constante. Los gradientes térmicos y los esfuerzos son elevados en esta zona. Pueden ser utilizados para asegurar la unión materiales de junta y adhesivos resistentes a las sustancias químicas. Adhesivo preferente es el epoxi, pero puede ser utilizada una técnica de estanqueidad metálica más robusta si la placa térmica es cilíndrica o de material cerámico.

Otros criterios para la zona de transición consisten en que el material de estanqueidad o de unión y el procedimiento para unir el soporte superior a la placa térmica debe ser resistente a las lejías y otras soluciones de limpieza. Se espera que puedan producirse hasta 1000 exposiciones a las soluciones de limpieza de por ejemplo un 10% de lejía y 1% de Tween 20.

El manguito térmico de la presente invención presenta una alta conducción térmica y una masa térmica reducida para permitir el rápido calentamiento y enfriamiento. Así mismo, el manguito térmico es lo suficientemente duradero para permitir su uso reiterado (hasta 10.000 inserciones en la cámara de reacción). Los elementos de calentamiento están integrados en el manguito para asegurar el rápido y eficiente calentamiento. Para potenciar al máximo la eficiencia de enfriamiento, los elementos de enfriamiento pueden, así mismo, ser fijados a la superficie, por ejemplo mediante unas aletas de enfriamiento o unos elementos térmicamente conductores conectados a una fuente de enfriamiento secundaria. Por ejemplo, el manguito puede ser térmicamente conectado a un elemento Peltier o a un tubo isotérmico.

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

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

El manguito térmico está, así mismo, adaptado para la interrogación óptica de los contenidos *in situ* proporcionando elementos ópticamente transmisores sobre el manguito y puede incorporar diversos elementos característicos como por ejemplo lentes y filtros para facilitar la visualización óptica. En una forma de realización, al menos las superficies del manguito son ópticamente transmisivas, constituyendo, de forma preferente el fondo del manguito adyacente a las zonas ópticas de una cámara de reacción insertada. Un importante criterio para el material de la ventana es la transparencia o translucencia de la ventana. La ventana, puede, así mismo, ser simplemente una abertura en el manguito a través de la cual la cámara de reacción pueda ser visualizada. En otra forma de realización, el manguito está abierto en el fondo para que una porción de una cámara insertada pueda extenderse por debajo del manguito para una interrogación óptica directa. Cuando la ventana es de un material específico, es preferente que la ventana coincida lo más exactamente posible con los coeficientes de expansión térmica (TCE) del manguito y de la ventana. Por ejemplo, puede ser elegido un vidrio con una TCE que coincida estrechamente con la del manguito cerámico. Una ventana de plástico es más apropiada si el manguito térmico es de metal. Asimismo es crítico que elmaterial de la ventana sea estable a la lejía y otras soluciones de limpieza. En particular, se considera que el interior de la camisa térmica se limpiará de manera periódica por pipeteado en soluciones de lejía diluida, seguido de agua, seguido de un alcohol seco. Estas soluciones estarán en contacto directo con la junta entre la ventana óptica y el intercambiador de calor. Esta transición también afecta de manera significativa a las funciones de iluminación y de concentración de luz del dispositivo.

La transición mecánica entre la ventana y los elementos térmicos constituye una junta crítica. Es conveniente mantener el paquete de los elementos ópticos a una temperatura relativamente baja, o al menos a una temperatura constante, mientras que el manguito térmico es sometido a muchos ciclos de temperatura de transición. Los

gradientes y esfuerzos térmicos son altos en esta zona. Otro criterio para la zona de transición es que cualquiera que sea el material y el procedimiento de estanqueidad de unión para unir la ventana óptica con el manguito térmico debe ser resistente a las lejías y a otras soluciones de limpieza. En particular, se prevé que el interior del manguito térmico sea limpiado de forma periódica introduciendo con una tipeta con soluciones de lejías diluidas, seguido de agua y después de un alcohol seco. Estas soluciones estarán en contacto directo con la unión existente entre la ventana óptica y el manguito térmico. Esta transición, así mismo, afecta de manera considerable a las funciones de iluminación y de concentración de luz del dispositivo.

Instrumento de intercambio de calor controlado

El montaje de los elementos ópticos puede ser fabricado en un instrumento que esté configurado para aceptar un manguito térmico. Dicho instrumento puede, asimismo, incorporar unos sistemas para el mantenimiento de las temperaturas ambientaless, como por ejemplo un sistema de enfriamiento y diversos mecanismos de control para regular las operaciones que se están llevando a cabo dentro de la cámara de intercambio de calor.

En la Fig. 9, se muestra el instrumento (600) con una carcasa (602) y unos elementos operativos asociados. El área de procesamiento (604) está adaptada para aceptar un manguito térmico (630) y una cámara de intercambio de calor (632) descrito *supra*. El área de procesamiento (604) está en comunicación neumática con un ventilador de enfriamiento (606) mediante un canal de entrada (608) y con un canal de salida (610) que conduce desde el área de procesamiento hasta un orificio de salida (612). Cuando una cámara (632) es insertada dentro del área de procesamiento (604), el depósito de la cámara queda expuesto al aire de enfriamiento que circula desde el ventilador hasta el canal de entrada (608), hasta el área de tratamiento (604). A continuación, el aire se desplaza por el canal de salida (610) para salir de la carcasa por el orificio (612). Asimismo, una cámara insertada está en comunicación óptica con un montaje de elementos ópticos (620) que incluye unos bloques de emisión y detección de elementos ópticos acoplados a unos cuadros de circuito (622) para el control de los elementos ópticos. El instrumento también incluye el sensor (614) para vigilar operaciones de calentamiento y enfriamiento de elementos ópticos.

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

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

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

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

Además del instrumento, se muestra en las Figs. 10a y 10b una forma de realización alternativa. El instrumento (650). incorpora un manguito térmico (670) (mostrado parcialmente en despiece ordenado desde el instrumento) con unas placas térmicas (672) que están fijadas a un soporte superior (674) para que coincidan con la carcasa (652). La carcasa (652) presenta una entrada de aire y un orificio de salida (654), un soporte (656) con unas placas de difusión de aire (658) y un módulo de elementos ópticos (660) con un cuadro de circuito unido (662). La dirección del flujo de aire de enfriamiento se muestra mediante las flechas.

El control electrónico entero de cada montaje de intercambio de calor puede ser incorporado dentro de uno o más cuadros de circuito o chips fijados a los lados de la carcasa. En la vista en sección transversal del instrumento mostrado en la Fig. 10b, el manguito térmico (670) con el soporte superior (674) se muestra parcialmente en despiece ordenado fuera de la carcasa (652) con el módulo de elementos ópticos (660) y el cuadro de circuito (662) de los elementos ópticos se sitúa en contacto con un par de cuadros de controlador (664). El cuadro de circuito (662) y los cuadros de controlador (664) pueden ser fabricados utilizando tecnología de imontaje de superficie, de bajo perfil y de gran fiabilidad. Los cuadros de controlador (664) comunican con el cuadro óptico a través de una hendidura practicada en la carcasa y con un conector eléctrico situado en un ángulo de 90º en el que el extremo inferior del cuadro de circuito se enchufa en un tomacorriente situado en una placa base para la comunicación eléctrica con el cuadro de controlador.

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

En las Figs. 11a y 11b, una agrupación de unidades de montaje de intercambio de calor modulares están dispuestas formando un conjunto. La Fig. 11a muestra una forma de realización de un sistema de intercambio de calor (700) con cuatro unidades de montaje (710), una de las cuales se muestra con un panel lateral retirado para dejar al descubierto la unidad interna, sobre un soporte de base (702). La Fig. 11c muestra otra forma de realización de un sistema de intercambio de calor (800) con ocho unidades (810) dispuestas sobre un soporte de base (802). En la Fig. 11a y en la vista en sección transversal mostrada en la Fig. 11b, cada unidad incorpora unos cuadros de circuito de elementos ópticos (712) los cuales se sitúan en contacto con la unidad de comando “madre” (704), por ejemplo un cuadro de controlador común. El cuadro de controlador único incorpora varios, por ejemplo cuatro, cuadros de circuito (no mostrados) de forma que el cuadro procesador “madre” (704) controla la agrupación de unidades. El convertidor de alimentación (706) del sistema suministra potencia a las unidades. Como alternativa, tal y como se muestra en la Fig. 11c, el cuadro de circuito (812) de los elementos ópticos de cada unidad (810) se sitúa en contacto con un cuadro de controlador individual (820) para que cada unidad tenga su propio cuadro de controlador. En la Fig. 11c un manguito térmico (814) con un soporte superior (816), un montaje de elementos ópticos (818) y un cuadro de circuito ópticos (812) se muestran retirados de la base (802).

En un formato de conjunto, el espacio libre existente entre las unidades pueden ser cerradas herméticamente mediante una placa estanca que cubra el conjunto entero. El soporte superior y la placa estanca pueden estar configurados para formar una superficie al mismo nivel para una configuración multiunidades. El material de la junta es, de modo preferente, resistente a la lejía y a otras soluciones de limpieza.

La placa de base (802) del conjunto de unidades de montaje puede desempeñar diversas funciones. Por ejemplo, la base puede permitir la instalación física de las unidades, la carcasa de un cuadro de controlador y una conexión eléctrica entre las unidades de montaje de intercambio de calor y un ordenador central. Un conector eléctrico multifuncional puede, así mismo, servir como instalación física.

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

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

Aunque en la presente memoria ha sido descrita la amplificación de los polinicleótidos mediante la reacción en cadena de la polimerasa, debe apreciarse por parte de los expertos en la materia, que los dispositivos y procedimientos de la presente invención pueden ser utilizados de manera igualmente efectiva respecto de una pluralidad de otras reacciones de amplificación de los polinucleótidos y de ensayos de unión de ligantes. Dichas

reacciones adicionales pueden ser sometidas a ciclos térmicos, como por ejemplo la reacción en cadena de la polimerasa, o bien pueden ser ejecutados a una sola temperatura (por ejemplo, la amplificación de base secuenciada del ácido nucleico (NASBA). Así mismo, dichas reacciones pueden emplear una amplia diversidad de reactivos de amplificación y enzimas, incluyendo el ADN ligasa, el T7 ARN polimerasa y/o la transcriptasa inversa, entre otras. Así mismo, la desnaturalización de los polinucleótidos puede llevarse a cabo mediante procedimientos químicos o físicos conocidos, solos o en combinación con un cambio térmico. Las reacciones de amplificación de los polinucleótidos que pueden llevarse a la práctica en el dispositivo de la invención incluyen, pero no se limitan a : (1) los procedimientos de amplificación de los polinucleótidos escogidos como objetivo, como por ejemplo la réplica de secuencias automantenida (3SR) y la amplificación de desplazamiento de la cadena (SDA): (2) procedimientos en base a la aplicación de una señal fijada al polinucleótido de referencia, como por ejemplo amplificación del ADN de “cadena ramificada”; (3) procedimientos basados en la amplificación de la sonda de ADN, como por ejemplo la reacción en cadena de la ligasa (LCR) y la amplificación de la replicasa QB (QBR); (4) los procedimientos basados en la transcripción, como por ejemplo la transcripción activada por ligazón (LAT) y la amplificación basada secuenciada del ácido nucléico (NASBA); y (5) otros diversos procedimientos de amplificación, como por ejemplo la reacción de la cadena de reparación (RCR) y la reacción de la sonda de ciclado (RSC).

Además de los procedimientos de amplificación diana o génicos mencionados con anterioridad, se prevén otras aplicaciones de reacción químicas o bioquímicas. Por ejemplo, la lisis de células a temperatura controlada es otra aplicación de la invención pretendida, la cual puede o puede no llevar a cabo los procedimientos de amplificación génicos o de referencia descritos con anterioridad. En muchos casos, esto se lleva a cabo mediante la elevación de la temperatura de la solución que contiene la célula hasta 37 ºC durante unos pocos minutos para permitir la acción de las enzimas proteolíticas seguido por la elevación de la temperatura y su mantenimiento a 95 ºC. Después de unos pocos segundos a minutos, la célula es lisada y el componente diana, tal como ácido nucleico, es liberado, pudiendo entonces avanzar el proceso, por ejemplo amplificado, sin manipulación adicional. En otras aplicaciones, se puede desear detener inmediatamente cualquier reacción química adicional, inmediatamente después de la lisis disminuyendo la temperatura a 0 º a 4 ºC, tal como en el caso en que el estudio del estado de expresión que usa la rápida reacción térmica en cadena de la polimerasa (RT-PCR). De modo que el aumento gradual rápido térmico proporcionado por este dispositivo permite dicha funcionalidad.

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

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

La presente invención ha sido descrita en las líneas anteriores con múltiples detalles con referencia a formas de realización concretas y a las figuras. Sin embargo, debe entenderse que pueden llevarse a cabo modificaciones y sustituciones en los dispositivos y procedimientos descritos en base a la presente divulgación, sin apartarse del amplio ámbito de la invención.

REIVINDICACIONES

1.- Un aparato para controlar la temperatura de una muestra, comprendiendo el aparato

a) un recipiente (60, 90) que tiene
   i) una cámara de reacción (2, 46, 50, 76) para contener la muestra, estando definida la cámara por dos paredes principales opuestas (72, 74) y una pluralidad de paredes secundarias rígidas (16, 62, 64, 66, 68, 70, 94, 96) que unen las paredes principales entre sí, en la que al menos una de las paredes principales comprende una hoja o película (18, 48);
   ii) un orificio (4) para introducir fluido dentro de la cámara; y
   iii) un canal (8, 80) que conecta el orificio con la cámara,
b) medios de calentamiento y al menos una superficie de calentamiento (36, 38, 52, 202, 204) asociada a dichos medios de calentamiento para ponerse en contacto la hoja o película, **caracterizado porque** comprende
c) un tapón (12, 84) que se puede insertar dentro del canal para aumentar la presión en la cámara, con lo que el aumento de presión en la cámara fuerza la hoja o película contra la superficie de calentamiento.

2.- El aparato según la reivindicación 1, en el que al menos dos de las paredes secundarias son transmisoras de luz, y en el que el aparato comprende, además, elementos ópticos para interrogar ópticamente la cámara al tiempo que la superficie de calentamiento está en contacto con la hoja o película, comprendiendo los elementos ópticos al menos una fuente de luz para transmitir luz a la cámara a través de una primera de las paredes transmisoras de luz y al menos un detector para detectar luz que sale de la cámara a través de una segunda de las paredes transmisoras de luz.

3.- El aparato según la reivindicación 2, en el que al menos una superficie de calentamiento está provista de un manguito térmico para recibir el recipiente, incluyendo el manguito al menos un calentador para calentar la superficie, teniendo el manguito al menos una ventana o abertura que proporciona acceso óptico a las paredes transmisoras de luz, y estando posicionados los elementos ópticos para interrogar la cámara a través de la al menos una ventana o abertura en el manguito.

4.- El aparato segúnla reivindicación 1, en el que la superficie de calentamiento comprende una superficie de una placa, teniendo la placa al menos un resistor de calentamiento acoplado a la misma.

5.- El aparato de la reivindicación 1, en el que cada una de las paredes principales comprende una hoja o película, el aparato incluye al menos dos superficies de calentamiento definidas por placas opuestas posicionadas para recibir el recipiente entre las mismas de manera que las placas estén en contacto con las paredes principales, y el aparato incluye dichos medios de calentamiento para calentar las placas.

6.- El aparato segúnla reivindicación 5, que comprende, además, al menos un soporte para mantener las placas en una relción de oposición entre sí, incluyendo el soporte una ranura para insertar la cámara del recipiente entre las placas.

7.- El aparato según la reivindicación 5, en el que al menos dos de las paredes secundarias son transmisoras de luz para proporcionar ventanas ópticas a la cámara, y en el que el aparato comprende, además, elementos ópticos para interrogar ópticamente la cámara a través de al menos una ventana o abertura entre las placas, comprendiendo los elementos ópticos al menos una fuente de luz para transmitir luz a la cámara a través de una primera de las paredes transmisoras de luz y al menos un detector para detectar luz que sale de la cámara a través de una segunda de las paredes transmisoras de luz.

8.- El aparato según la reivindicación 7, en el que los elementos ópticos incluyen:

i) una pluralidad de fuentes de luz y filtros para transmitir diferentes longitudes de onda de luz de excitación a la cámara,;
ii) una pluralidad de detectores y filtros para detectar diferentes longitudes de onda de luz emitida desde la cámara.

9.- El aparato según la reivindicación 7, en el que las placas, medios de calentamiento, y elementos ópticos están incorporados en una unidad de intercambio de calor, el aparato comprende, además, un soporte de base para recibir la unidad de intercambio de calor, y el soporte de base incluye al menos un controlador para controlar la operación de la unidad de intercambio de calor.

10.- El aparato según la reivindicación 9, en el que la unidad de intercambio de calor comprende, además:

i) una carcasa para contener las placas, medios de calentamieno y elementos ópticos; y
ii) un elemento de enfriamiento dispuesto dentro de la carcasa para enfriar la cámara

11.- El aparato según la reivindicación2, en el que las paredes transmisoras de luz estan angularmente descentradas aproximadamente 90º la una de la otra, y en el que los elementos ópticos proporcionan aproximadamente un ángulo de 90º entre las trayectorias ópticas de excitación y de detección.

12.- El aparato según la reivindicación 1, en el que el aparato incluye una fuente de calor para calentar la superficie, y el aparato incluye, además, un elemento de enfriamiento para enfriar la cámara

13.- El aparato según la reivindicación 10 o 12, en el que el elemento de enfriamiento comprende un ventilador para soplar aire de enfriamiento.

14.- El aparato según la reivindicación 13, en el que el soporte de base está construido para recibir y controlar independientemente una pluralidad de tales unidades de intercambio de calor.

15.- Un procedimiento para llevar a cabo una reacción química utilizando un aparato que comprende:

a) un recipiente que tiene

i) una cámara de reacción para contener la muestra, estando definida la cámara por dos paredes principales opuestas y una pluralidad de paredes secundarias rígidas que unen las paredes principales entre sí, en el que al menos una de las paredes principales comprende una hoja o película;
ii) un orificio para introducir fluido dentro de la cámara;

b) al menos una superficie de calentamiento para poner en contacto la hoja o película; y
c) un capuchón que se puede insertar en el orificio para aumentar la presión en la cámara, por lo que el aumento de presión en la cámara fuerza la hoja o película contra la superficie de calentamiento, comprendiendo el procedimiento las etpas de

1) añadir una muestra a través del orificio dentro de la cámara de reacción
2) exponer la muestra a variaciones de temperatura activando un elemento de calentamiento /enfriamiento; y
3) interrogar ópticamente la muestra en la cámara de reacción para la reacción química o el producto de reacción.

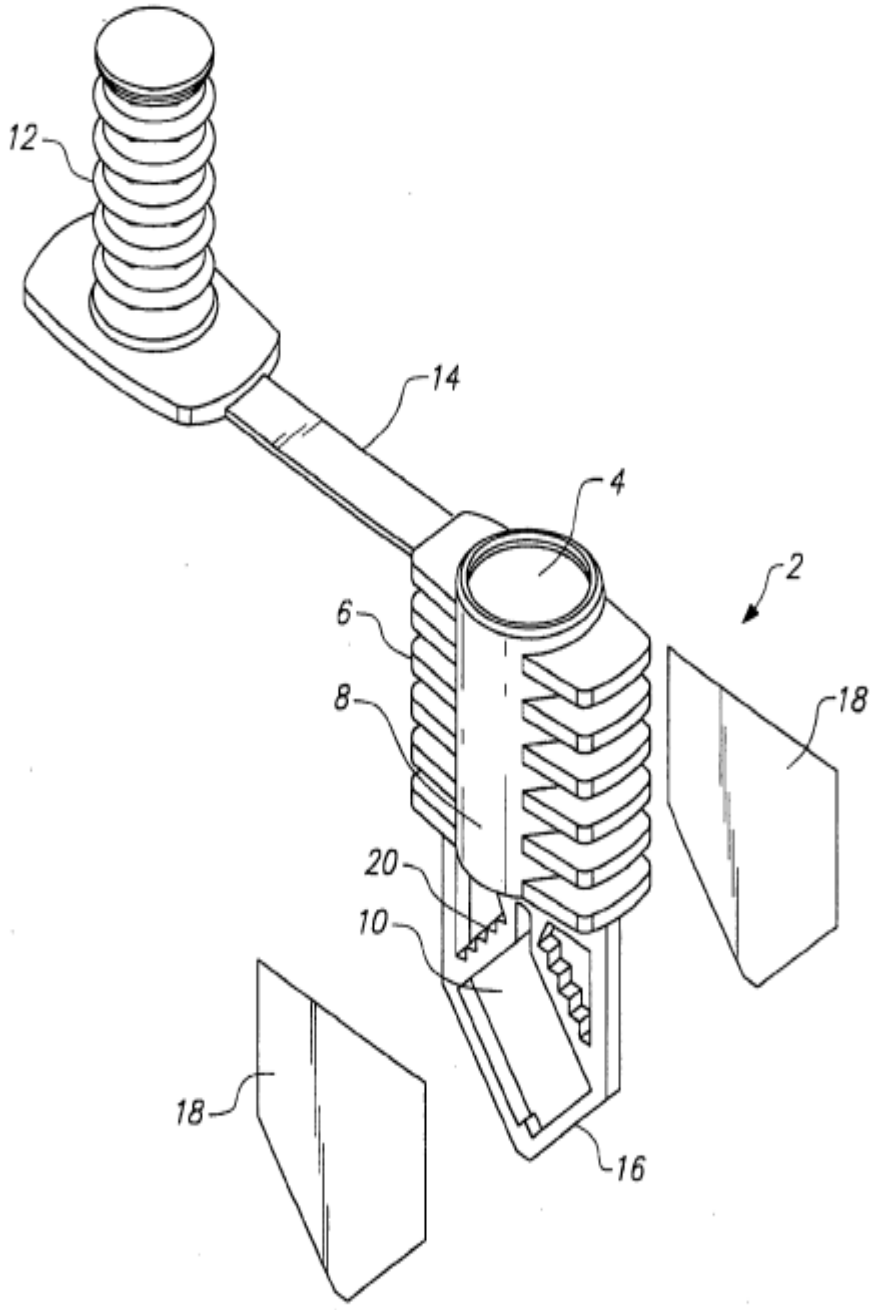


FIG. 1

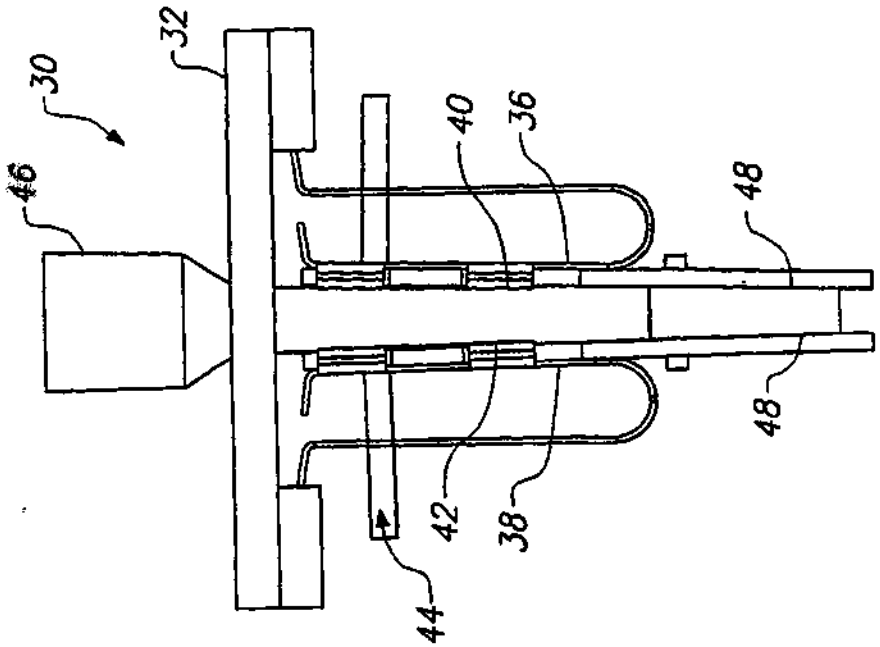


FIG. 2b

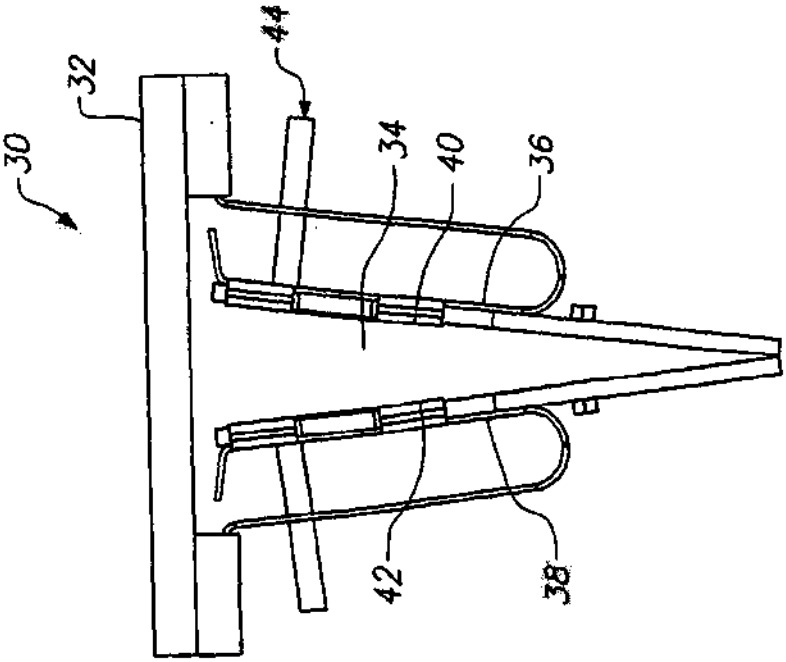


FIG. 2a

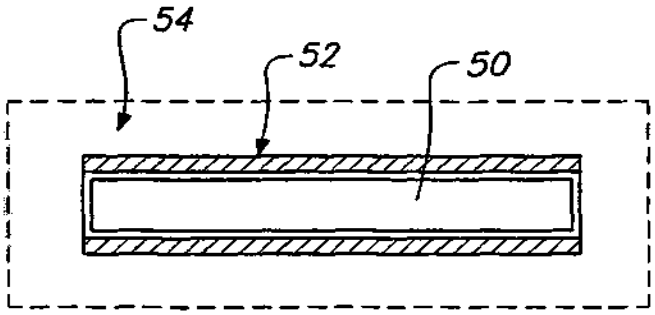


FIG. 3

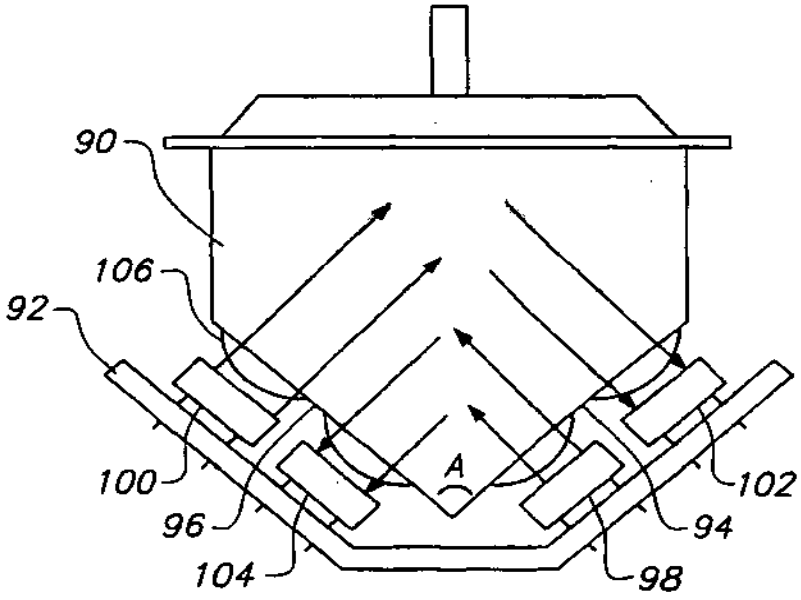


FIG. 5

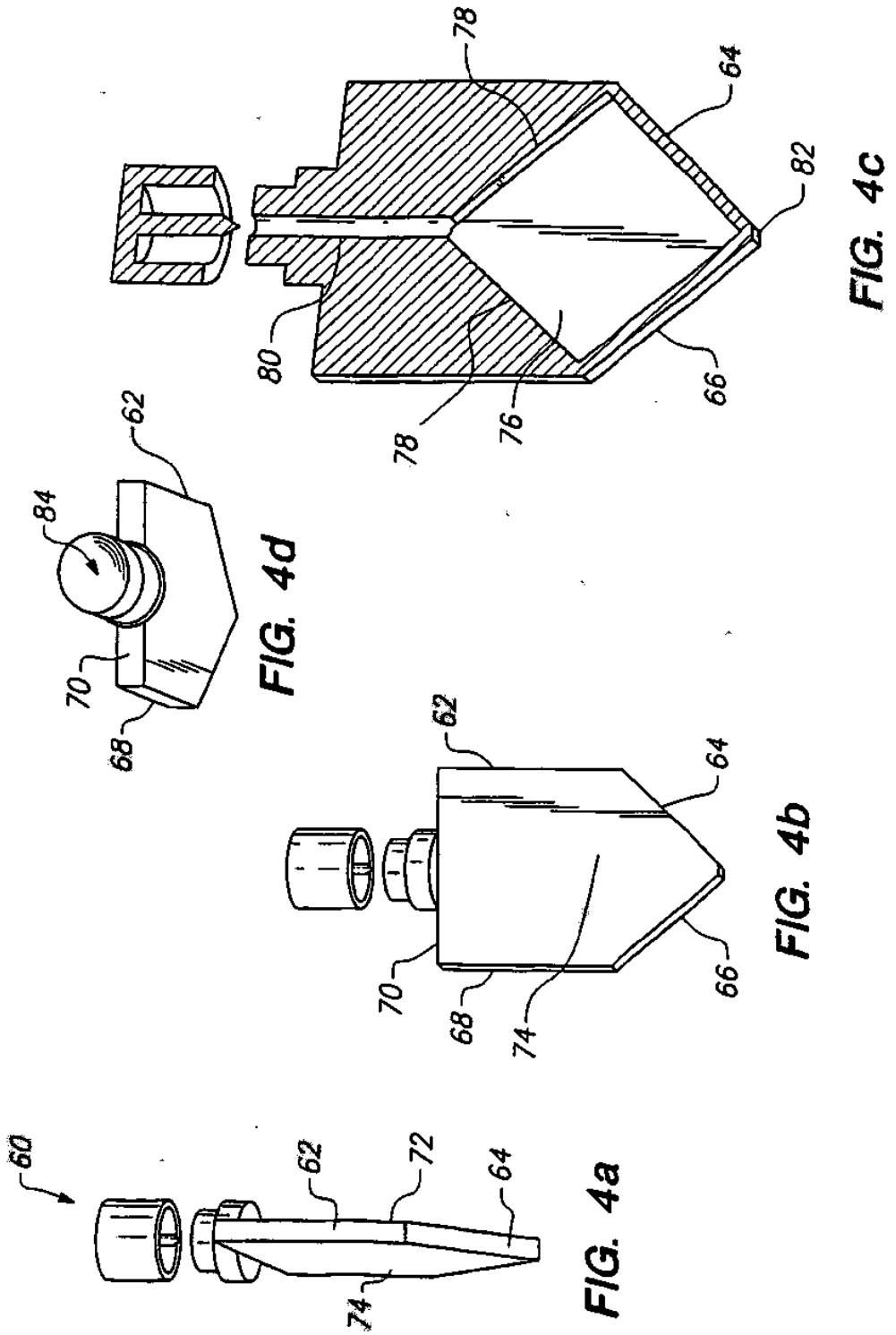


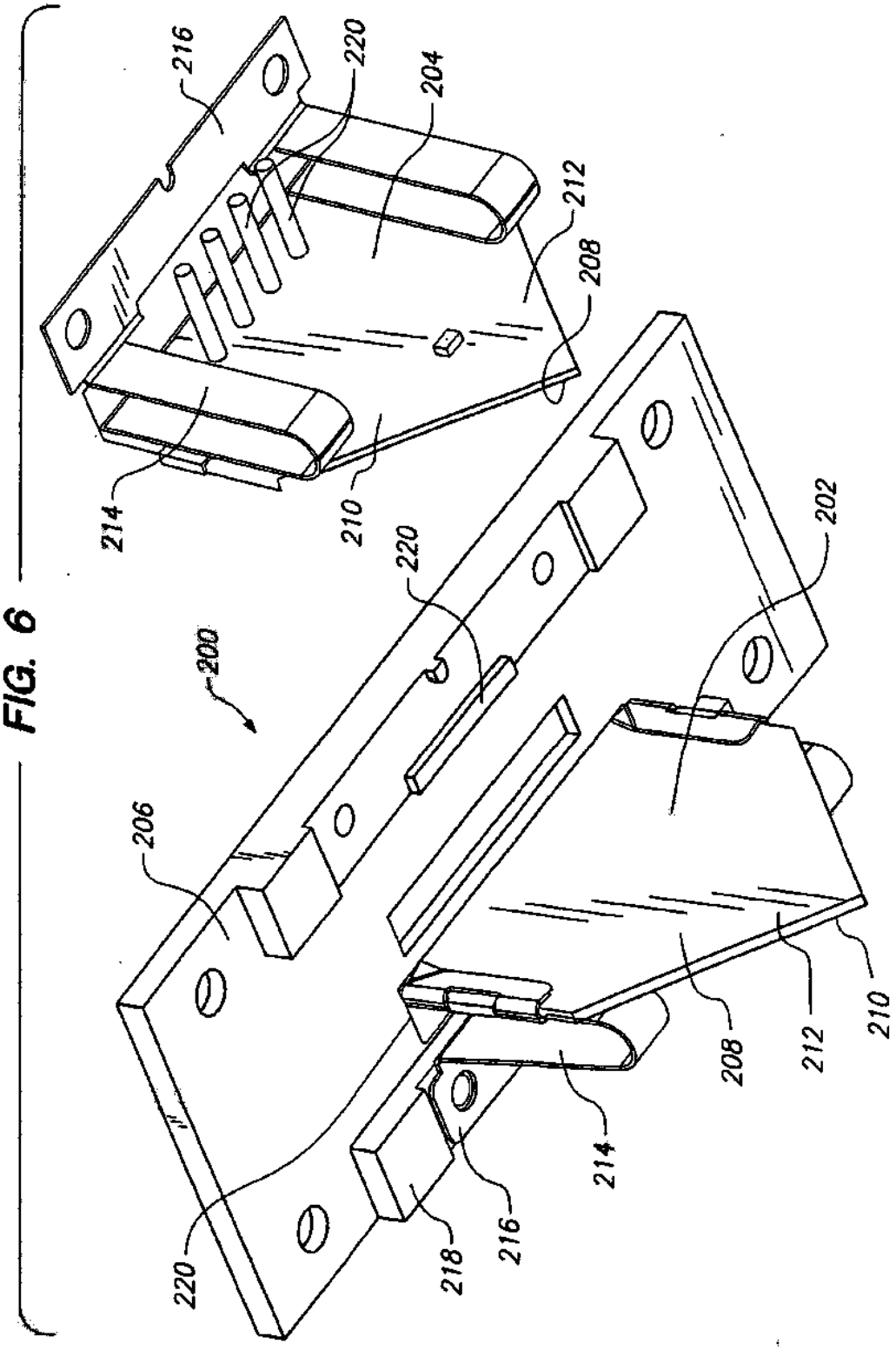
FIG. 4a

FIG. 4b

FIG. 4d

FIG. 4c

FIG. 6


216
220
204
212
208
214
210
200
220
202
206
208
212
210
214
216
218
220

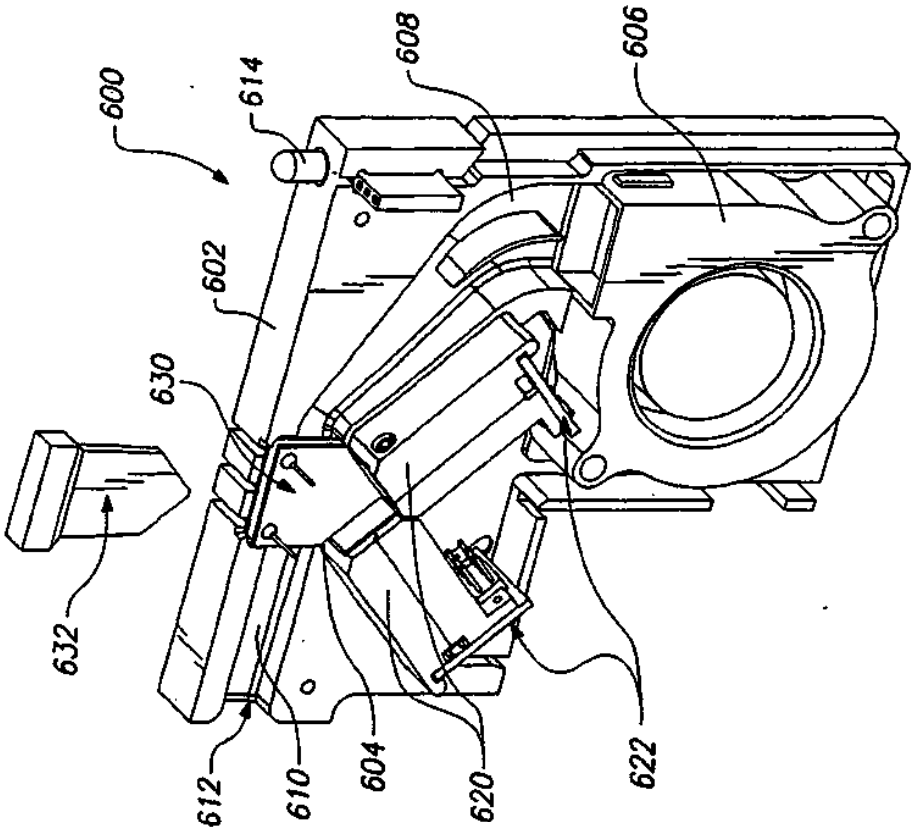

600
614
608
606
602
630
632
612
610
604
620
622

FIG. 9

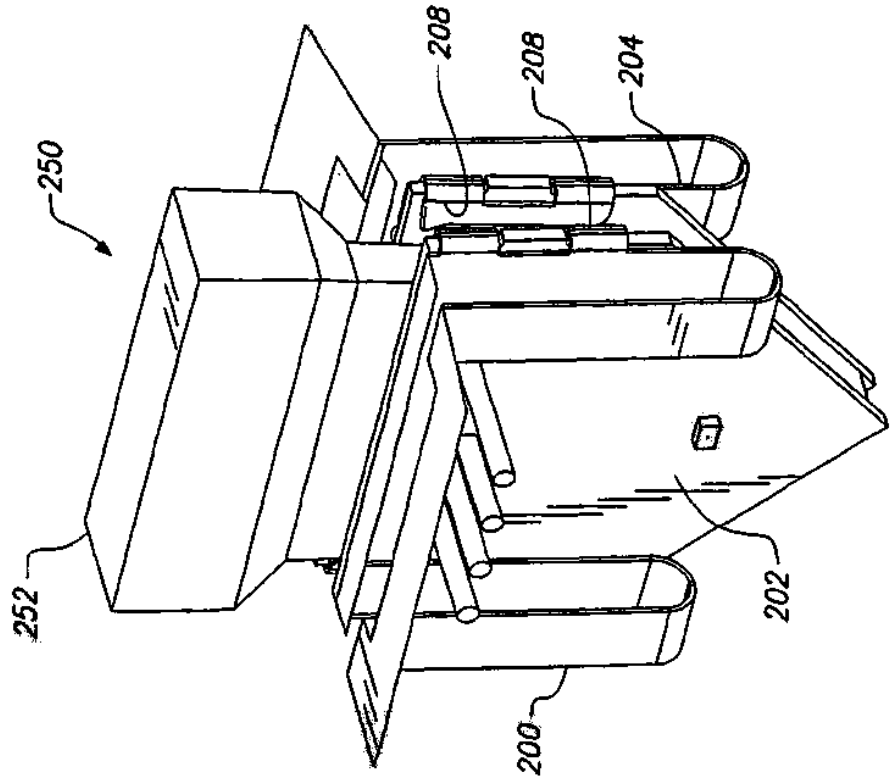

250
208
208
204
252
202
200

FIG. 7

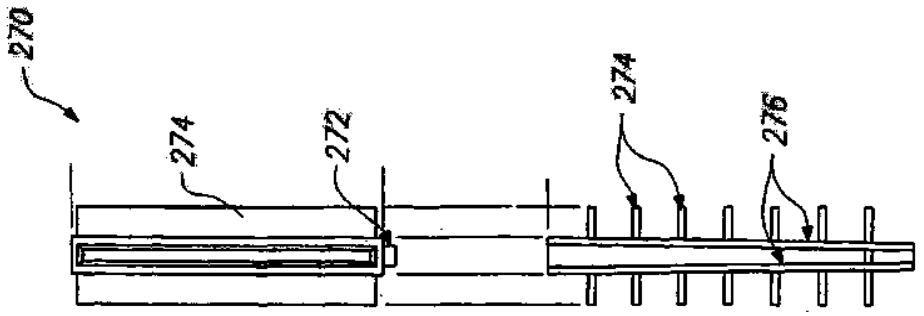


FIG. 8d

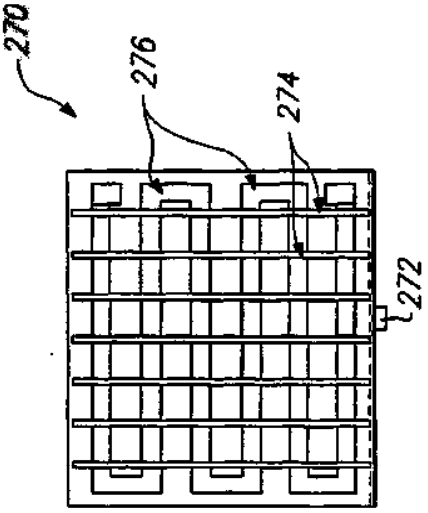


FIG. 8c

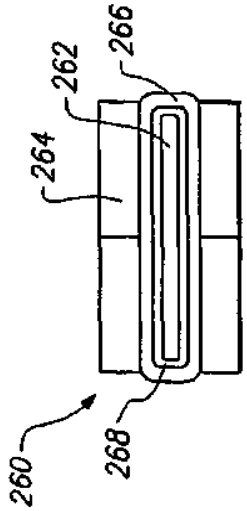


FIG. 8a

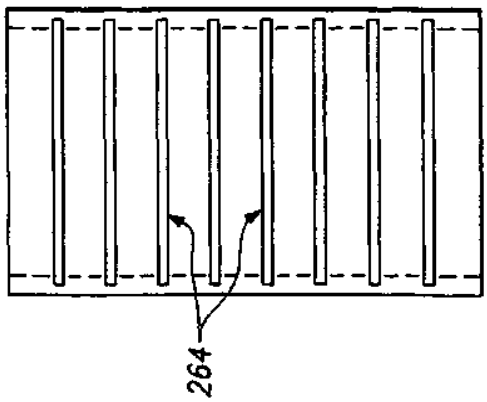


FIG. 8b

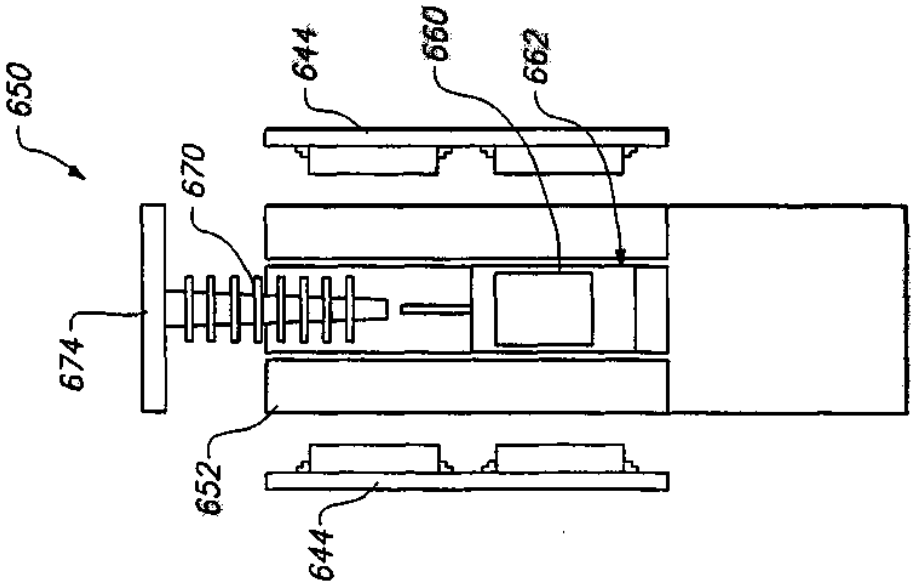


FIG. 10b

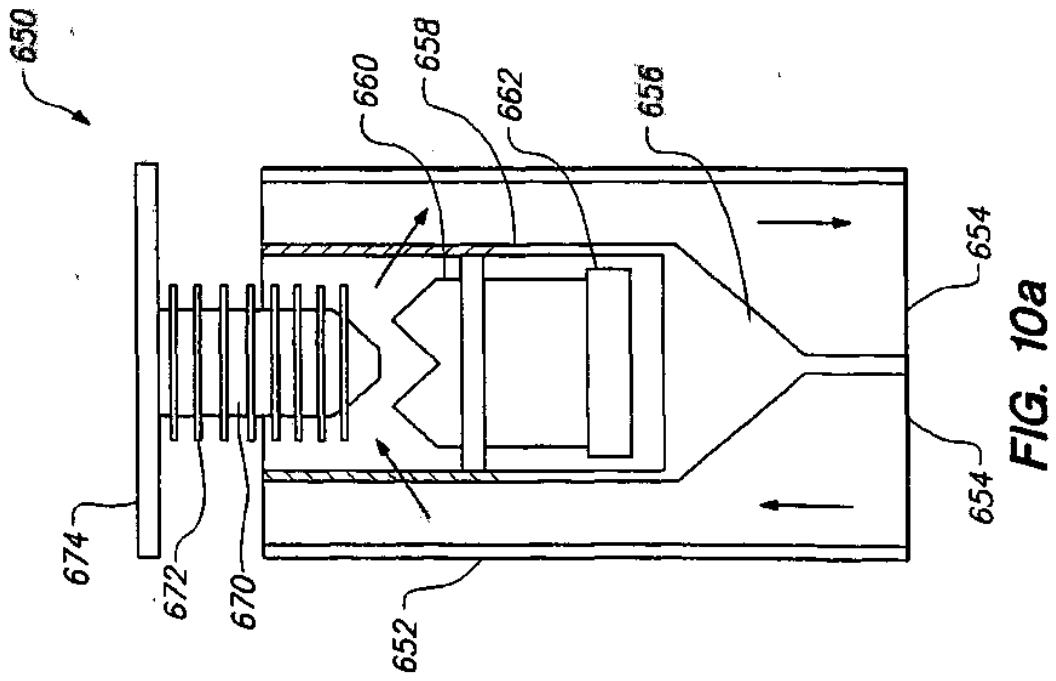


FIG. 10a

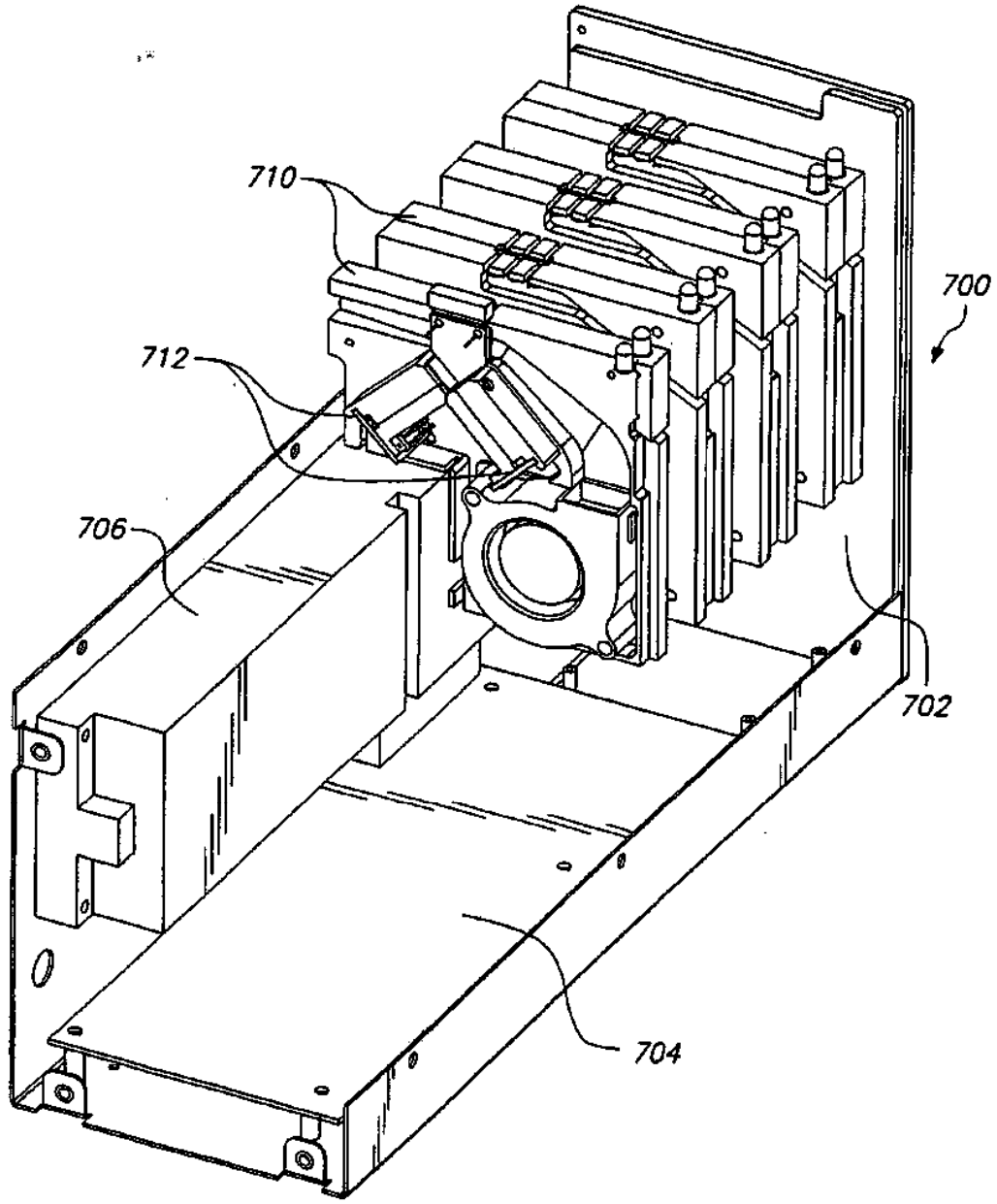


FIG. 11a

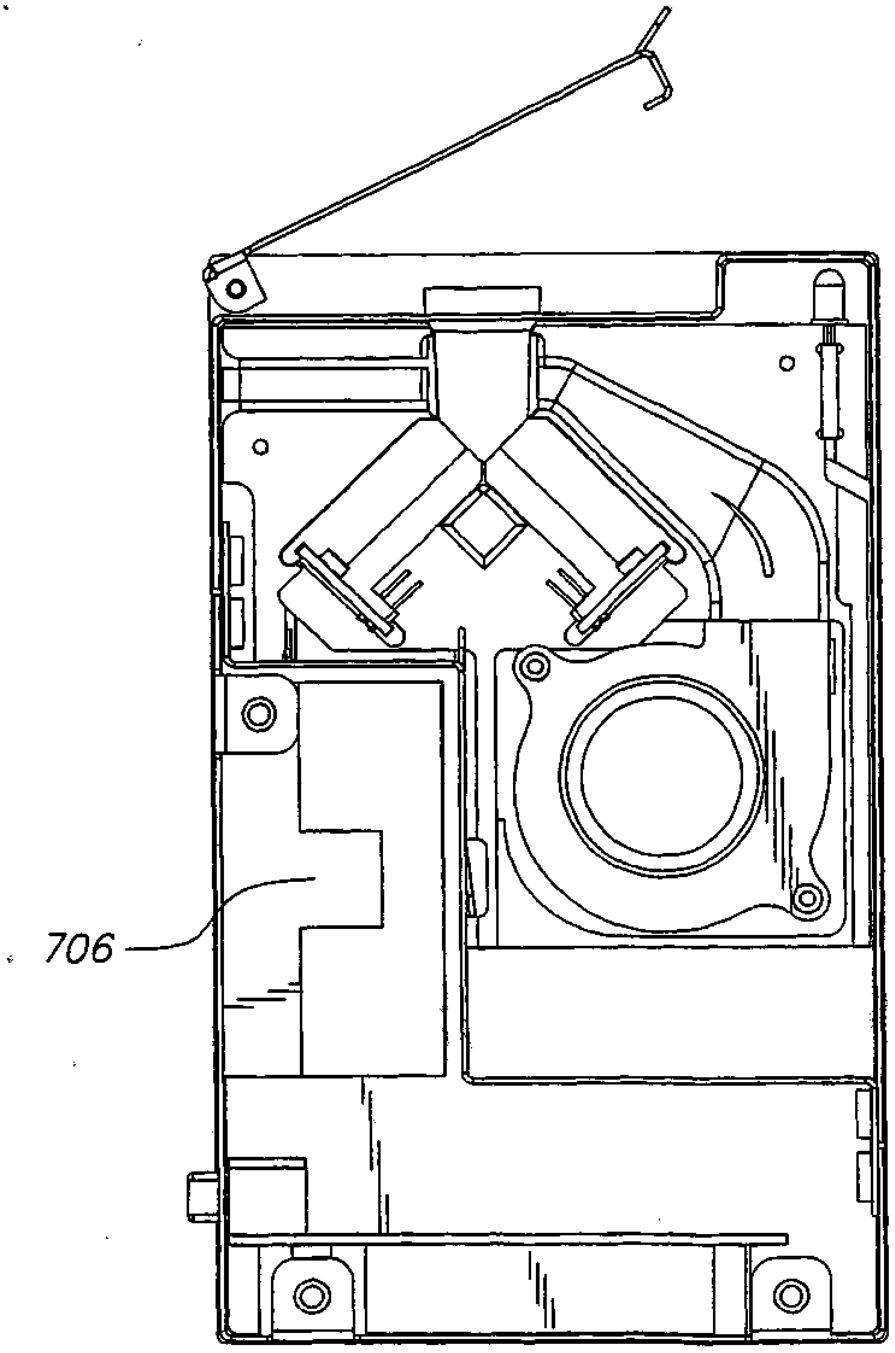


FIG. 11b

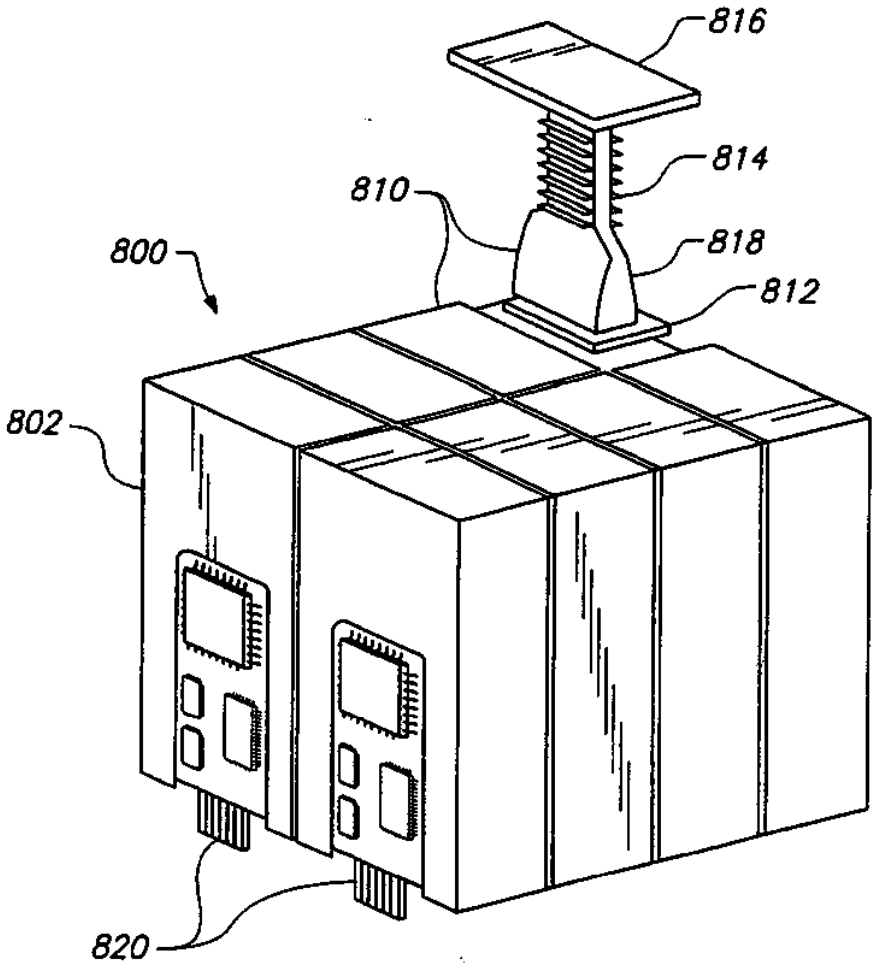


FIG. 11c