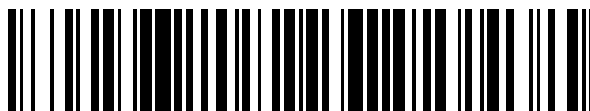


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 544 455**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

B01L 7/00 (2006.01)

G01N 21/03 (2006.01)

G01N 1/31 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.03.1998 E 10181257 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2015 EP 2308995**

54 Título: **Montaje para reacción química con intercambio de calor, ópticamente interrogada**

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:
31.08.2015

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

ES 2 544 455 T3

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

DESCRIPCIÓN

Montaje para reacción química con intercambio de calor, ópticamente interrogada

Campo de la invención

La presente invención es un dispositivo de utilidad en procesos químicos de intercambio de calor y 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 esas 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 el presente documento 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 refrigeración. A menudo es conveniente controlar el cambio de temperatura de una manera que consiga con precisión la temperatura objetivo, evitando quedarse corto o sobrepasar la temperatura, y alcance rápidamente la temperatura objetivo. Tal control de la temperatura puede impedir reacciones colaterales, la formación de burbujas no deseadas, la degradación de los componentes a determinadas temperaturas, etc., 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 la energía de activación para la reacción. Ejemplos de reacciones químicas térmicas incluyen la amplificación isotérmica de los ácidos nucleicos, la amplificación del ciclado térmico, tal como 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. Además, puede llevarse a cabo la lisis condicionada por la temperatura de microorganismos 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 que la etapa de amplificación. Los sistemas de control de la temperatura permiten, asimismo, 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, tal como baños de agua, baños de aire y bloques sólidos, tal como aluminio. Asimismo, 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 refrigerado ya sea mediante un aparato de calentamiento / refrigeración Peltier, o bien mediante un sistema de calentamiento / refrigeración 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 y refrigeración se limitan, a aproximadamente, 1 °C / segundo lo que se traduce en unos tiempos de tratamiento más largos. Por ejemplo, en la aplicación de la PCR, cincuenta ciclos pueden requerir dos o más horas para su desarrollo.

Parte de la razón por la que el bloque de metal sea de tamaño relativamente grande estriba en proporcionar una masa suficiente para asegurar una temperatura constante y uniforme en cada sitio de reacción, además de sitio a sitio. Algunos instrumentos de reacción de transferencia de calor incorporan, asimismo, una placa superior, que es refrigerada 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 para la uniformidad de la temperatura, necesitan un largo periodo de tiempo (y o una fuente de potencia de calentamiento / refrigeración de gran tamaño) para calentar y refrigerar. La velocidad habitual de calentamiento y refrigeración para estos tipos de instrumentos es del orden de 1 a 3 °C / segundo.

Típicamente la velocidad de calentamiento más alta que puede obtenerse en instrumentos comerciales es del orden de 3 °C / segundo, y las velocidades de refrigeración son considerablemente inferiores. Con estas velocidades de refrigeración 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, tal como "dímeros cebadores" de la PCR o amplicones anómalos, que 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.

Asimismo, 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 debería ser de al menos 0,1 ml; para muestras más diluidas, incluso son necesarios volúmenes de muestras mayores. Por consiguiente, el sistema de análisis químico debe diseñarse para manejar una amplia variedad de volúmenes de fluido, desde nanolitros hasta mililitros.

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 / refrigeración. 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 químicas como la luz emitida, que será detectada para generar la señal óptica.

El control de los cambios de calentamiento y refrigeración pueden ser designados como ciclado térmico. El término "ciclado térmico" pretende significar en el presente documento 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 de partida. El ciclo de temperaturas puede llevarse a cabo una vez o ser repetido tantas veces como sea necesario para la reacción química concreta. Las diversas reacciones químicas que se producen durante estos ciclos de temperaturas son más específicas y más eficientes cuando la temperatura es subida y bajada a las diversas temperaturas de reacción requeridas lo más rápidamente posible y es controlada con mucha precisión.

Dispositivos convencionales para el control de las reacciones mediadas por enzimas

Los dispositivos que controlan la transferencia de calor para las reacciones químicas son aplicables en las reacciones de síntesis, tal como la PCR de ciclado térmico para amplificar un segmento nucleico. En esta metodología, 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 °C) para la deshibridación de la plantilla bicatenaria del ADN, seguido por temperaturas más bajas (de 40 a 60 °C para el recocido de los cebadores y de 70 a 75 °C para la polimerización). El sometimiento repetido a ciclos entre las temperaturas de deshibridación, hibridación y polimerización proporciona una amplificación exponencial de la plantilla de ADN. Por ejemplo hasta 1 µg de ADN objetivo hasta 2 kb 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 diversidad de muestras incluyendo muestras forenses, agrícolas, veterinarias y similares; el análisis de las mutaciones en los oncogenes activados, la detección de contaminantes en muestras, tal como 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, tal como 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 y el 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 está disponible solo en los últimos tiempos. Por ejemplo, el instrumento Perkin Elmer (PE) 7700 ATC, así como el termociclador PE 9600, están basados 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 refrigeración lentas 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 que 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 refrigeración y sitios de interrogación óptica. Este instrumento es mucho más simple que el ATC, sin embargo, no se configura fácilmente para aplicaciones 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 Northrup et al., como se divulga en la patente de los EE.UU. n.º. 5.589.136, incorporada en el presente documento por referencia. Este dispositivo utiliza una técnica modular para el sometimiento térmico a ciclo de la PCR y para el análisis óptico. Cada reacción se lleva a cabo dentro de su propio manguito 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 simples 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 simples y eficientes, sino que la baja masa térmica sometida a ciclo térmico hace posible que el dispositivo MATCI desarrolle unas velocidades de calentamiento y refrigeración extremadamente rápidas, de calentamiento de hasta 30 °C / seg. y de refrigeración de 5 °C / seg.

Sin embargo los inconvenientes en este dispositivo MATCI es que 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 refrigeración en el que la muestra reacciona debería ser diseñado para potenciar al máximo las velocidades de calentamiento y refrigeración. Asimismo, es conveniente que tal sistema sea adaptado para permitir la interrogación óptica en tiempo real y para aceptar diversos tamaños de muestras.

Sumario de la invención

La invención proporciona un recipiente de reacción como se presenta en la reivindicación 1. Un recipiente de reacción tal como se define en el preámbulo de la reivindicación 1 se conoce del documento US-A-5589136.

También se describe en el presente documento un montaje para controlar y llevar a cabo reacciones químicas de intercambio de calor. El montaje 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 montaje tiene una cámara de intercambio de calor adaptada 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 adaptar 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 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 montaje 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.

Las paredes pueden ser placas paralelas opuestas y el recipiente de muestra está colocado entre dichas 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 refrigeración, 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 montaje; y una placa de circuito

impreso para controlar el montaje de elementos ópticos y para recoger la señal de salida del montaje 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 refrigerar. Una tarjeta controladora supervisa y controla el intercambio de calor y recoge y analiza datos.

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, 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 perspectiva 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 haya 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 refrigeración 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 perspectiva 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 una 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 refrigeración 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 refrigeración del manguito, la Figura 8b es una vista frontal de los elementos de refrigeración mostrados en la Figura 8a, la Figura 8c es una vista frontal de otro manguito con elementos de calentamiento y refrigeración 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 refrigeración, y un recipiente de reacción 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 refrigeración, en las que la Figura 10a muestra una vista frontal de tal montaje y la Figura 10b muestra una vista lateral de tal 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 refrigeración mecánico de masa térmica reducida que está adaptado para el rápido calentamiento y/o refrigeración 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 refrigeración, dado que hay poco material que calentar y refrigerar y porque hay una alta relación de la superficie con respecto al volumen para la transferencia térmica. Aquellos expertos en la técnica solo han apreciado recientemente que el rápido calentamiento y refrigeración mejora la eficiencia y reduce la cantidad de reacciones extrañas no deseables y que determinadas reacciones podrían 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, tal como la PCR (velocidades de calentamiento y refrigeración 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 refrigeración 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, que 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 refrigeración. El instrumento presenta, asimismo, 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, asimismo, 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, que 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. Asimismo, 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. Asimismo, 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 transmitida 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 refrigeración 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 / refrigeración. 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 refrigeración. La estructura 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 / refrigeración externo de una manera que evite o reduzca al mínimo los espacios libres entre las dos superficies. Asimismo, 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. Asimismo, 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 refrigeración. 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 refrigeración (36), (38), están en posición relajada con una abertura (34) entre las placas. Sin embargo, tal y como se representa en la Fig. 2b, cuando la cámara (46) con las paredes flexibles (48) es insertada en la abertura entre las dos placas (36), (38) de calentamiento o refrigeración 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 presenta 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), que está en íntimo contacto con los elementos de calentamiento (52) y está rodeada por la cámara de refrigeración (54). El grosor de la estructura de pared es de 0,000254 cm hasta 0,0508 cm, normalmente aproximadamente de 0,00127 cm hasta 0,0127 cm y, preferentemente, aproximadamente de 0,00254 cm hasta 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, preferentemente, se presenten bajo la forma de una película u hoja. Cuando el bastidor de la cámara que soporta las paredes esté hecho de un material específico, tal como polipropileno, las paredes son, preferentemente, de los mismos materiales, tal como polipropileno, para que las velocidades de expansión y refrigeración de las paredes sean las mismas que las del bastidor. Por consiguiente, se reducen al mínimo los esfuerzos indebidos inducidos por el calor o la refrigeración 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 preferentes, las paredes que contactan con los elementos de calentamiento pueden, asimismo, 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 a la refrigeración de las sustancias químicas contenidas en su interior. La cámara, asimismo, 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 en 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).

En la 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, en la que un canal para muestras (80) conduce al depósito (76). El canal y el depósito que incluyen las paredes traseras pueden, opcionalmente, 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, tal como un llenado del fondo o un área para mantener llenos a rebosar los reactivos y purgado el aire.

Las caras 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 necesita conectar para formar un punto, pero pueden estar separadas por una porción intermedia, tal como otra cara secundaria o diversos elementos característicos mecánicos o fluidicos que no interfieran significativamente con las prestaciones térmicas y ópticas de la cámara. Por ejemplo, las caras en ángulo pueden confluir en un orificio que conduzca a otra área de tratamiento en comunicación con la cámara de reacción, tal como un área de electroforesis capilar integrada.

La cara secundaria superior (70) puede estar acoplada a los extremos de las caras paralelas (62), (68) como se

muestra 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, asimismo, permitir otros procedimientos convencionales de introducción de muestras, tal como por medio de un sistema de inyección de fluido automático o por medio de un colector fluidico que, opcionalmente, forme parte integrante de la cámara. La cámara puede, asimismo, 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 fluidico desechable se divulga en la solicitud de Patente estadounidense en tramitación, con el número de serie 08/998,188, presentada el 24 de diciembre de 1997.

El terminal externo del orificio está diseñado para ser cerrado de forma hermética, preferentemente, 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.

El capuchón puede ser un capuchón de ajuste rápido, una tapa roscada, u otro cierre especial que se necesite para el protocolo analítico seleccionado. Tal capuchón puede estar compuesto por cualquier material oportuno, tal como polipropileno o un elastómero, tal como Santopreno™ (marca registrada de Monsanto Corporation, ubicada en San Louis, Missouri). La cámara puede quedar, asimismo, cerrada herméticamente desde el entorno exterior mediante el calentamiento del material plástico aplicado sobre o que componga la cara secundaria superior. Como alternativa, 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 un tapón 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 presión aumentada 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 forzar 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.

Ambas ventanas pueden servir 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) que están 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, asimismo, 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) incorporan 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 90°. Un ángulo de 90° entre las trayectorias ópticas de excitación y detección asegura que una mínima cantidad de radiación de excitación que entra a través de la cara secundaria salga a través de otra cara secundaria de detección. Asimismo, el ángulo de 90° permite que una cantidad máxima de radiación emitida, por ejemplo de fluorescencia, sea recogida a través de la ventana de detección. En otras formas de realización, el ángulo existente entre las paredes ópticas existentes es mayor o menor de 90° dependiendo, *inter alia*, de la eficiencia y la sensibilidad de los elementos ópticos de excitación y detección. Por ejemplo, cuando un sistema de detección discrimine de manera eficaz entre la luz de excitación y la emitida, puede desearse un único ángulo de 90° entre las paredes. Por el contrario, cuando un sistema de detección no consigue discriminar de manera eficaz entre la luz de excitación y la emitida, puede resultar de interés un ángulo mayor de 90°.

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 fluorescencia 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. Asimismo, 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. 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, tales como 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 magnetronica 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 (transmisivos) en determinadas longitudes de ondas en ángulos de incidencia, y reflectantes en otras. Esta es la base de muchos perfeccionamientos de materiales ópticos y de dispositivos tales como divisores del haz dicróico, filtros pasobanda dieléctricos, filtros de densidad neutral, etc.

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 moldeada en varias piezas las cuales sean unidas entre sí o moldeadas por inyección en una sola pieza. Existen varias ventajas en la técnica del diseño y la fabricación en múltiples piezas. Una ventaja es que pueden obtenerse paredes muy delgadas de forma que las paredes puedan ser fabricadas de manera homogénea para que tengan los mismos tamaño y forma. Otra ventaja es que las características ópticas del dispositivo están separadas de las características fluidicas de manera que ambos componentes puedan ser diseñados y realizados de forma óptima independientemente. 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 fluidoico primario. Una ventaja adicional es que las superficies principales pueden ser fabricadas a partir de un material diferente de los de algunas o todas las superficies secundarias. Por ejemplo, los materiales con características térmicas óptimas pueden ser diferentes de aquellos con características ópticas óptimas. En particular, las ventanas ópticas en ángulo, con o sin componentes de luz, podrían ser moldeadas a partir de policarbonato, que presenta una transparencia óptica satisfactoria, mientras que el resto de la cámara podría ser moldeada a partir de polipropileno, que 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, preferentemente, el fondo de la cámara.

En 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 moldeado por inyección estándar para materiales térmicos. Después de fabricar el bastidor, las paredes principales son fabricadas colocando y, preferentemente, 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 sea 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.

- 5 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 preferentemente, encajado a presión dentro del recipiente. El inserto puede, asimismo, proporcionar el canal, el orificio y el medio de fijación del capuchón.

- 10 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. Asimismo, 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 centralmente suspendida que comprende las caras principales flexibles. La
- 15 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, preferentemente, 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 /
- 20 refrigeración; unas paredes delgadas, de masa reducida; unas paredes principales conformables para potenciar al máximo su asociación con el sistema de calentamiento y refrigeración; 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
- 25 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, tales como superficies retrorreflectantes; unas paredes
- 30 principales que se ajusten de modo preciso con las superficies de calentamiento / refrigeración, 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

- 35 La cámara es compatible con un manguito térmico para el calentamiento o refrigeración 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 refrigeración (202) fijada al puente de soporte (206) y otra placa (204) retirada de la superficie de soporte (206). Cada
- 40 placa de calentamiento o refrigeración (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 sujeto
- 45 a la zona de sujeción (218) al puente. Las superficies presionantes (210) de las placas, presentan, asimismo, una pluralidad de conexiones eléctricas (220), las cuales pueden comunicar con las fuentes de calentamiento, refrigeración 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.

- 50 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 (no mostrada) de una manera que potencie al máximo el contacto térmico. En general, el manguito puede consistir en una o más, y preferentemente dos placas calentadoras separadas cargadas por muelle configuradas para presionar
- 55 mecánicamente contra la superficie, por ejemplo el área de la 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, tal como una
- 60 presión por flujo de aire, presión hidráulica y similares. El interior del manguito de intercambio de calor puede,

asimismo, estar ahusado para permitir el ajuste sin huelgo con el inserto de la cámara de reacción. Asimismo, 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. La abertura del manguito para que se produzca el contacto con las paredes de la cámara puede ser 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. Preferentemente, 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. Tal 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 refrigeración) a partir de una muestra en un tubo de reacción requiere un montaje de manguito térmico con una masa térmica reducida junto con un tubo 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, que son relativamente fáciles de calentar y refrigerar con rapidez. Sin embargo, estos sistemas son solo adecuados para volúmenes de muestras muy pequeños (tanto el Light Cycler como el MATCI están diseñados para solamente 10-20 μ l). Frente a ello, el tubo descrito en el presente documento 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, asimismo, conseguirse grandes velocidades de calentamiento y refrigeración 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 μ l), puede ser calentado de manera controlada y refrigerado 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, tal como politetrafluoroetileno, o el manguito entero puede ser fabricado a partir de un material químicamente estable, tal como un material cerámico o metales, tal como nitrato de aluminio, óxido de aluminio, óxido de berilio, y nitrato de silicio. Otros materiales que pueden ser utilizados incluyen, por ejemplo, arseniuro de galio, silicio, nitrato de silicio, dióxido de silicio, cuarzo, vidrio, diamante, poliacrílicos, poliamidas, policarbonatos, poliésteres, poliimidas, polímeros de vinilo, y polímeros de vinilo halogenados, tal como politetrafluoroetilenos. Otros posibles materiales incluyen materiales termopar, como por ejemplo cromo-aluminio, superaleaciones, "zyrcalloys", aluminio, acero, oro, plata, cobre, tungsteno, molibdeno, tantalito, 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 porque 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 cámaras 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, tal como unos resistores de calentamiento, pueden ser directamente serigrafiados sobre una placa, especialmente placas que consisten en materiales aislantes de cerámica, tal como nitrato 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. La fuente de calentamiento forma parte integrante de las placas 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, tal como un elemento calefactor de papel metalizado grabado al ácido (Minco Products situada en Minneapolis, MN) fijado a la superficie de las placas de calentamiento. Opcionalmente, unas aletas de refrigeración, 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 Fig. 6, y descrito con anterioridad, consiste en servir como soporte de uno o más elementos de calentamiento o refrigeración 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 están hechas de cerámica, el material preferente 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 refrigeración puede ser sometida a ciclo muchas veces (hasta 400.000 a lo largo de una vida de 5 años), por ejemplo, en aplicaciones de PCR entre aproximadamente la temperatura ambiente, 60 °C, y 95 °C, mientras el soporte superior puede ser mantenido a una temperatura relativamente constante. Los gradientes térmicos y los esfuerzos son elevados en esta zona. Pueden ser utilizados para asegurar la unión materiales de junta y adhesivos resistentes a las sustancias químicas. Adhesivo preferente es el epoxi, pero puede ser utilizada una técnica de estanqueidad metálica más robusta si la placa térmica es cilíndrica o de material cerámico.

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

El manguito térmico descrito en el presente documento presenta una alta conducción térmica y una masa térmica reducida para permitir el rápido calentamiento y refrigeración. Asimismo, 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 refrigeración, los elementos de refrigeración pueden, asimismo, ser fijados a la superficie, tal como mediante unas aletas de refrigeración o unos elementos térmicamente conductores conectados a una fuente de refrigeración 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 refrigeración 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 refrigeración (264) y de unos calentadores integrados (266). En la figura 8a el manguito está provisto de un revestimiento interior delgado (268). La Fig. 8b es una vista frontal de las aletas de refrigeración (264) mostrada en las Figs. 8a. La Fig. 8c es una vista frontal de otro manguito (270) con elementos de calentamiento (276) y de refrigeración (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 refrigeración (274).

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

El manguito térmico está, asimismo, 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. Por ejemplo, al menos las superficies del manguito pueden ser ópticamente transmisivas, constituyendo preferentemente 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, asimismo, ser simplemente una abertura en el manguito a través de la cual la cámara de reacción pueda ser visualizada. El manguito puede estar 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 el material 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

5 térmico sea limpiado de forma periódica introduciendo 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, asimismo, afecta de manera considerable a las funciones de iluminación y de concentración de luz del dispositivo.

Instrumento de intercambio de calor controlado

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

15 En la Fig. 9, se muestra el instrumento (600) con una carcasa (602) y unos elementos operativos asociados. Un 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 refrigeración (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 refrigeración que circula desde el

20 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 refrigeración de elementos

25 ópticos.

El montaje óptico consiste en unos elementos lenticulares, tales como 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, que pueden ser fijados a un cuadro de circuito, que puede

30 contener unos LED y unos fotodetectores. Los componentes lenticulares pueden ser moldeados por inyección a partir de materiales plásticos transparentes, tal como 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, que contienen unos LED de estado sólido y unos fotodetectores.

35 Los LED y los fotodetectores en estado sólido están, opcionalmente, 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 proporcionan una conexión eléctrica entre el cuadro óptico y el cuadro controlador adyacente.

40 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 refrigeración, por ejemplo, el aire, y guiar de manera eficiente el flujo de fluido a través de la superficie del manguito térmico / cámara.

45 Una fuente de refrigeración, tal como 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 refrigeración, tal como agua o una fuente de refrigeración de gas comprimido, o similares. El elemento de refrigeración 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.

50 Por ejemplo, cada manguito térmico de un conjunto de montajes de intercambio de calor puede comunicar con un elemento de refrigeración. Asimismo, unos orificios situados dentro de la carcasa pueden proporcionar una entrada de aire de refrigeración y unos orificios de salida. Los orificios pueden, asimismo, ser cerrados herméticamente a una placa de base utilizando unos obturantes apropiados, en los que los orificios se sitúan en contacto con los orificios de entrada y salida con la placa de base.

55 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 refrigeración se muestra mediante las flechas.

Todo el control electrónico 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 montaje 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 90° en el que el extremo inferior del cuadro de circuito se enchufa en un toma de corriente eléctrica situada en una placa base para la comunicación eléctrica con el cuadro de controlador.

Asimismo, pueden ser agrupados conjuntamente en múltiples unidades de montaje, como en los aparatos de reacción convencionales, tal como 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 independientes, 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 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), que 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 del sistema (706) suministra potencia a las unidades. Como alternativa, tal y como se muestra en la Fig. 11c, el cuadro de circuito de los elementos ópticos (812) 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 puede ser cerrado 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, preferentemente, 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, asimismo, 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. Asimismo, la estrecha separación en una dirección hace posible el uso de conjuntos de unidades lineales enlazados, si se desea. Por ejemplo: 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, que 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 montaje de reacción térmica, según la invención, puede ser utilizado en muchas aplicaciones. El aparato de la invención 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, tal como 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 el presente documento ha sido descrita la amplificación de los polinucleótidos mediante la reacción en cadena de la polimerasa, debe apreciarse por parte de los expertos en la materia, que los dispositivos y

procedimientos descritos en el presente documento 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. Tales reacciones adicionales pueden ser sometidas a ciclos térmicos, tal como 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). Asimismo, tales 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. Asimismo, 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 objetivo, tal como 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 objetivo, tal como amplificación del ADN de "cadena ramificada"; (3) procedimientos basados en la amplificación de la sonda de ADN, tal como la reacción en cadena de la ligasa (LCR) y la amplificación de la replicasa QB (QBR); (4) los procedimientos basados en la transcripción, tal como la transcripción activada por ligazón (LAT) y la amplificación basada secuenciada del ácido nucleico (NASBA); y (5) otros diversos procedimientos de amplificación, tal como la reacción de la cadena de reparación (RCR) y la reacción de la sonda de ciclado (RSC).

Además de los procedimientos de amplificación objetivo 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, que puede o puede no llevar a cabo los procedimientos de amplificación génicos u objetivos descritos con anterioridad. En muchos casos, esto se lleva a cabo mediante la elevación de la temperatura de la solución que contiene la célula hasta 37 °C durante unos pocos minutos para permitir la acción de las enzimas proteolíticas seguido por la elevación de la temperatura y su mantenimiento a 95 °C. Después de unos pocos segundos a minutos, la célula es lisada y el componente objetivo, 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 ° a 4 °C, 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 °C a 4 °C, 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 °C hasta una temperatura de reacción óptima. De esta forma se reducen o eliminan las reacciones secundarias no deseadas que se producen a temperaturas intermedias, posibilitando unas mediciones más precisas y una pureza más alta del producto. Asimismo, 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.

Tal control de las temperaturas puede ser explotado para reacciones de unión de ligantes, tal como 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.

REIVINDICACIONES

- 1.- Un recipiente de reacción (46, 50, 60, 90) que comprende:
 - a) dos paredes principales opuestas (18, 48, 72, 74), en el que al menos una de las paredes principales comprende una hoja o película;
 - 5 b) una pluralidad de paredes secundarias contiguas (16, 62, 64, 66, 68, 70, 94, 96) que unen las paredes principales entre sí para formar una cámara de reacción (10); y
 - c) un orificio para introducir fluido dentro de la cámara,

caracterizado porque dos de las paredes secundarias son transmisoras de luz para proporcionar respectivas ventanas ópticas a la cámara, y que la relación de la conductancia térmica de las paredes principales respecto de las paredes secundarias es al menos de 2:1.
- 10 2.- El recipiente de la reivindicación 1, en el que la hoja o película tiene un grosor de aproximadamente 0,000254 cm a aproximadamente 0,0508 cm, y es suficientemente flexible para adaptarse a una superficie de calentamiento o de refrigeración.
- 15 3.- El recipiente de la reivindicación 2, donde cada una de las dos paredes principales opuestas de la cámara comprende una hoja o película, siendo cada una de las hojas o películas suficientemente flexible para adaptarse a una respectiva superficie de calentamiento.
- 4.- El recipiente de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que cada una de las hojas o películas comprende un material polimérico.
- 20 5.- El recipiente de la reivindicación 1, en el que cada una de las paredes transmisoras de luz sirve para la excitación y detección para dos trayectorias de luz, la primera trayectoria de luz irradiada a través de una primera ventana óptica y detectada a través de una segunda ventana óptica y la segunda trayectoria de luz irradiada a través de la segunda ventana óptica y detectada a través de la primera ventana óptica, estando las paredes transmisoras de luz angularmente descentradas la una de la otra para potenciar al máximo el proceso de detección.
- 25 6.- El recipiente de la reivindicación 5, en el que las paredes transmisoras de luz están angularmente descentradas aproximadamente 90 ° la una de la otra.
- 7.- El recipiente de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende además un medio de sellado (12, 84) para sellar el orificio.
- 8.- El recipiente de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende además un canal que conecta el orificio con la cámara.
- 30 9.- El recipiente de una cualquiera de la reivindicación 8, que comprende además un tapón que se puede insertar dentro del canal para aumentar la presión en la cámara.
- 10.- El recipiente de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende al menos cuatro paredes secundarias, siendo al menos dos de las paredes secundarias paredes transmisoras de luz, y siendo al menos las otras dos de las paredes secundarias paredes retrorreflectantes para reflejar luz en la cámara.
- 35 11.- El recipiente de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende además elementos o revestimientos ópticos en las paredes transmisoras de luz para permitir que solo ciertas longitudes de ondas de luz pasen a través de las paredes.
- 12.- El recipiente de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que cada una de las paredes transmisoras de luz tiene una lente moldeada dentro de su superficie.
- 40 13.- El recipiente de un cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, que comprende además al menos un reactivo en la cámara.
- 14.- El recipiente de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que la relación del área de superficie total de las paredes principales respecto de las paredes secundarias es al menos de 2:1.

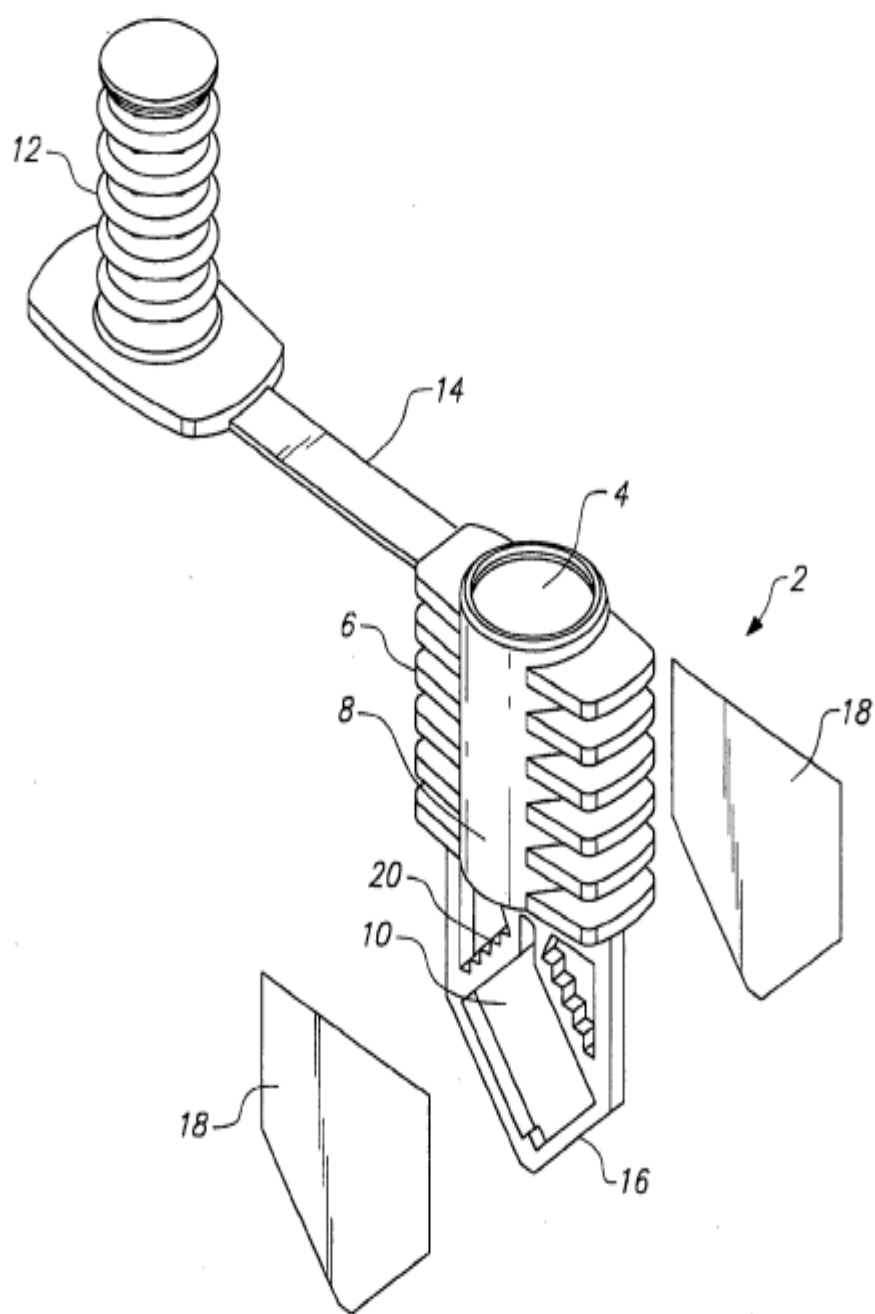


FIG. 1

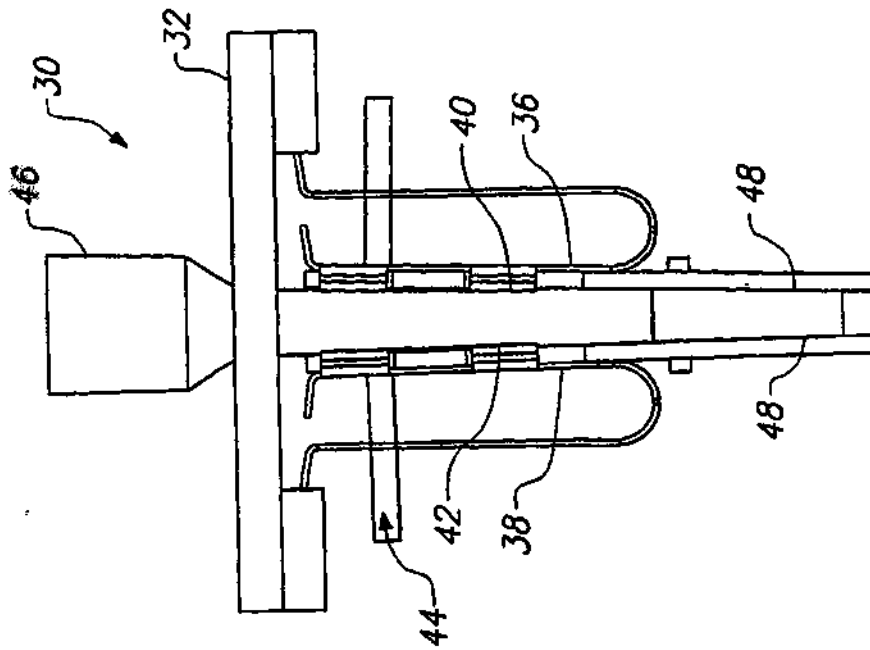


FIG. 2b

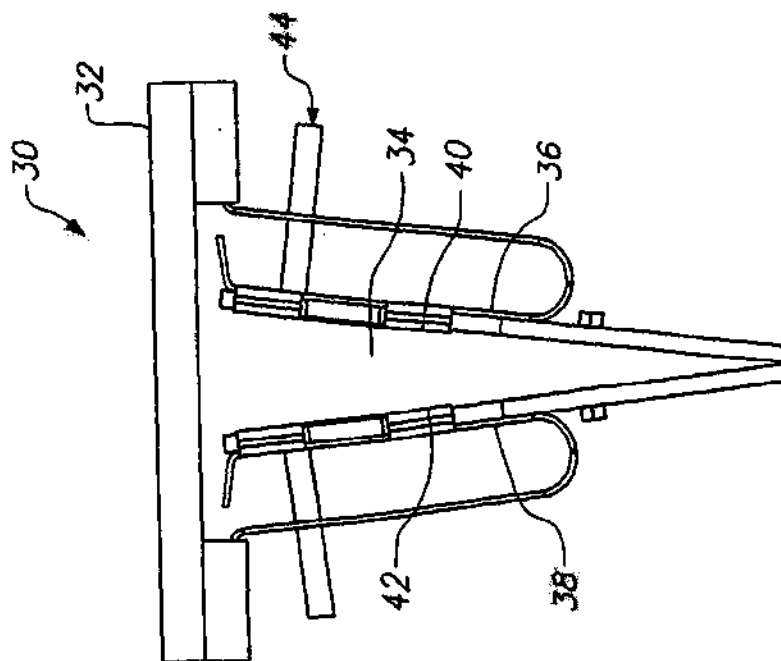


FIG. 2a

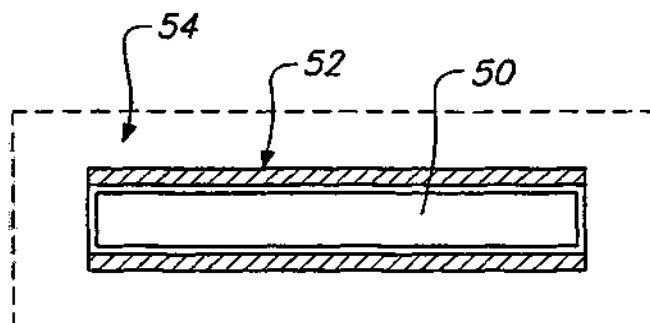


FIG. 3

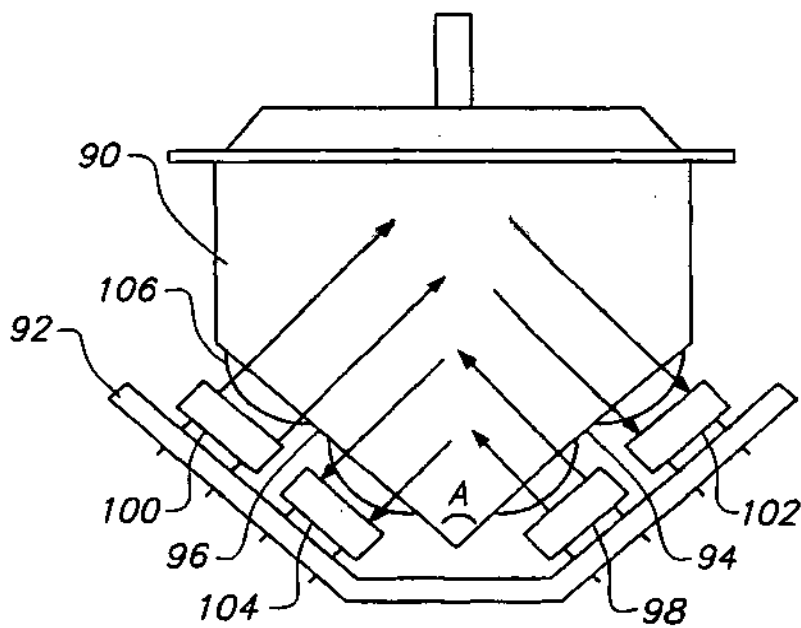


FIG. 5

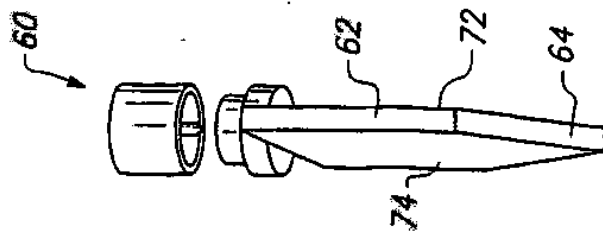


FIG. 4a

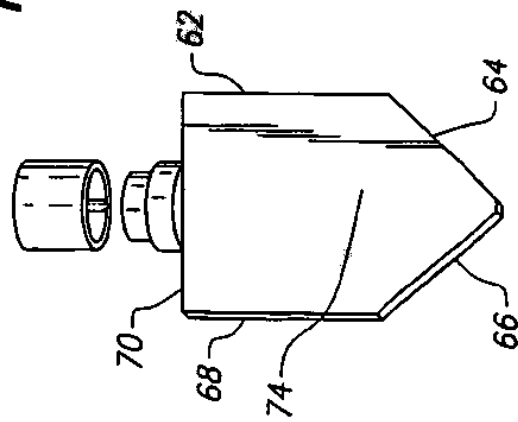


FIG. 4b

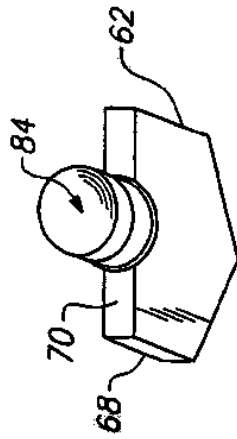


FIG. 4d

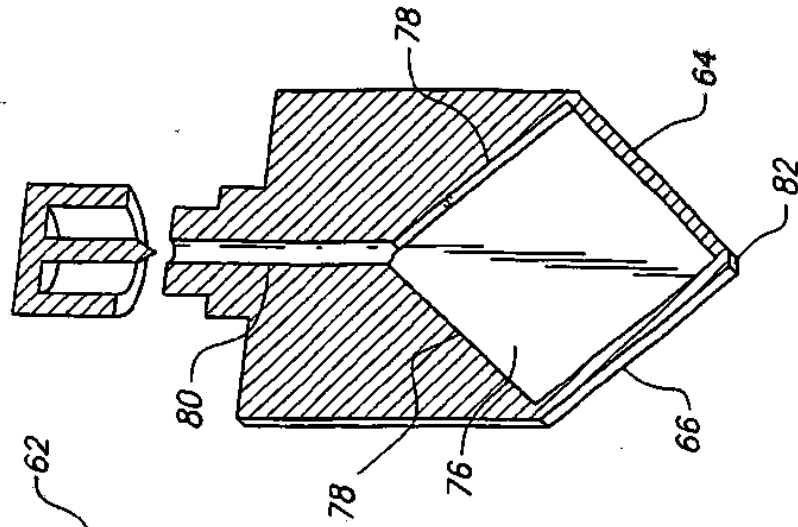
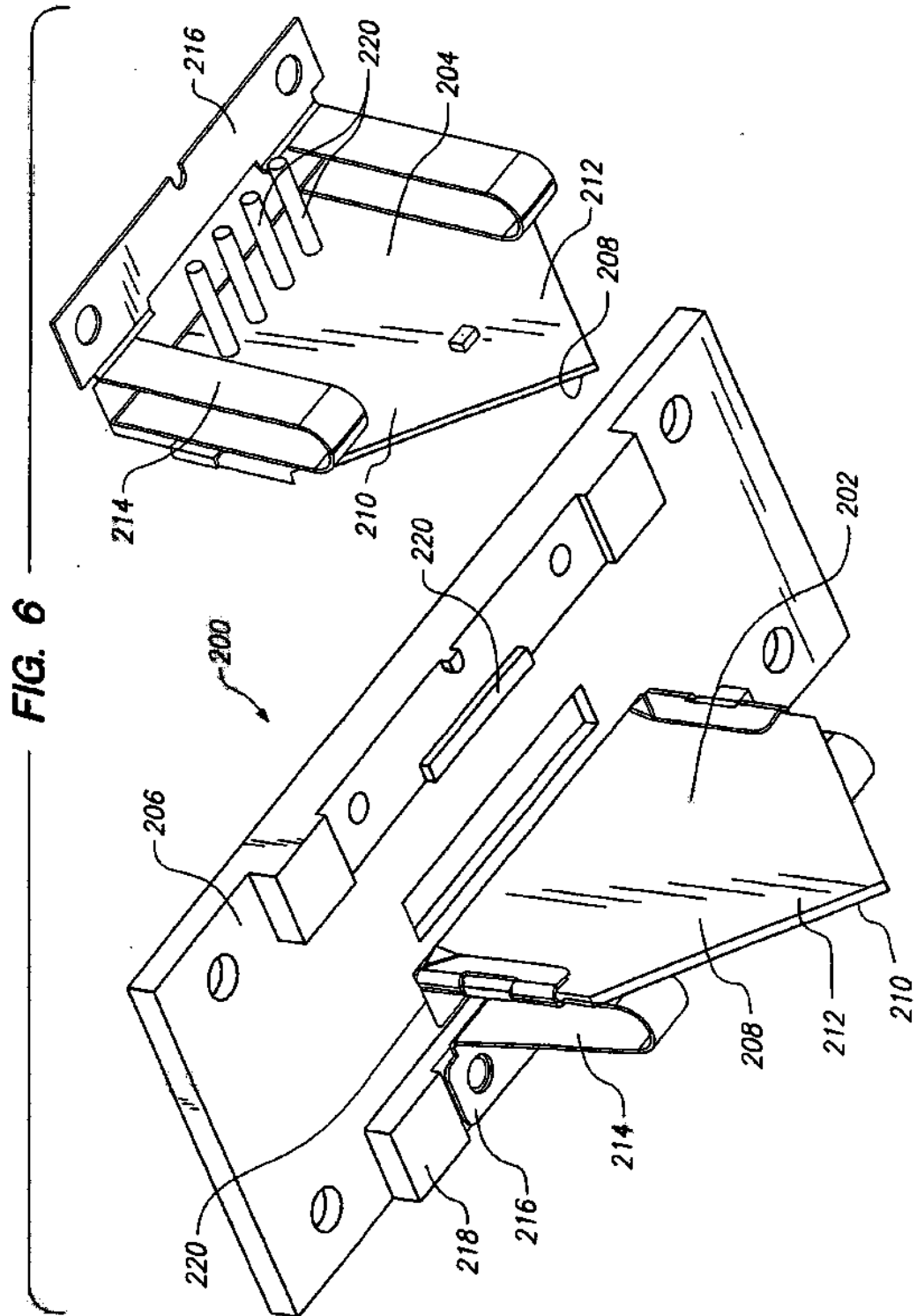


FIG. 4c



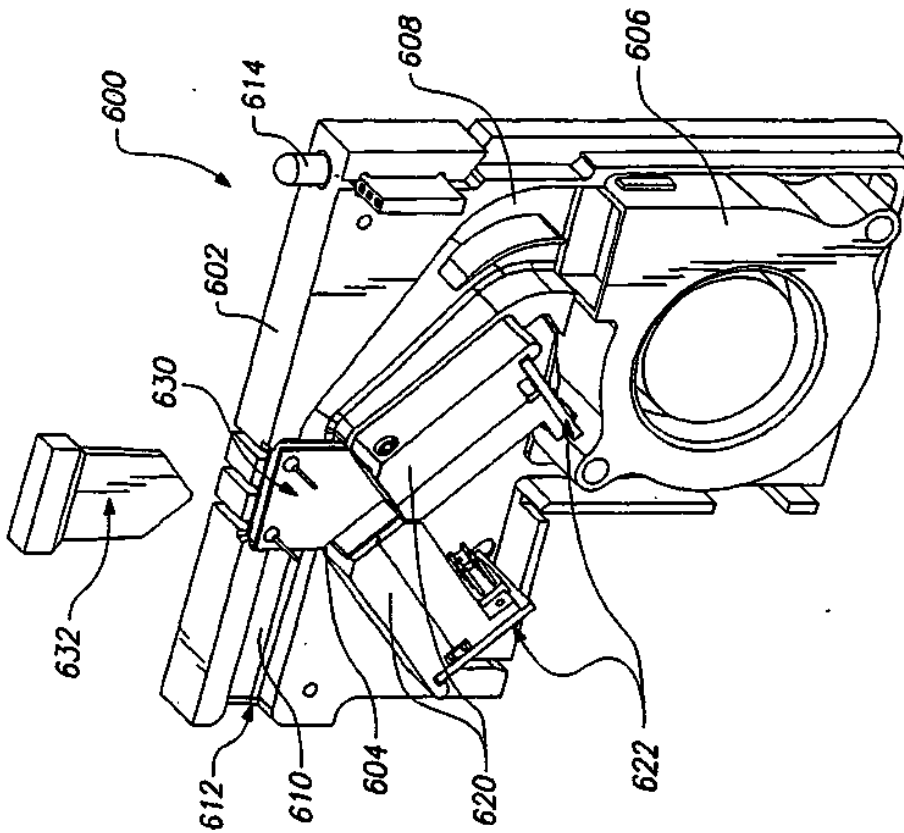


FIG. 9

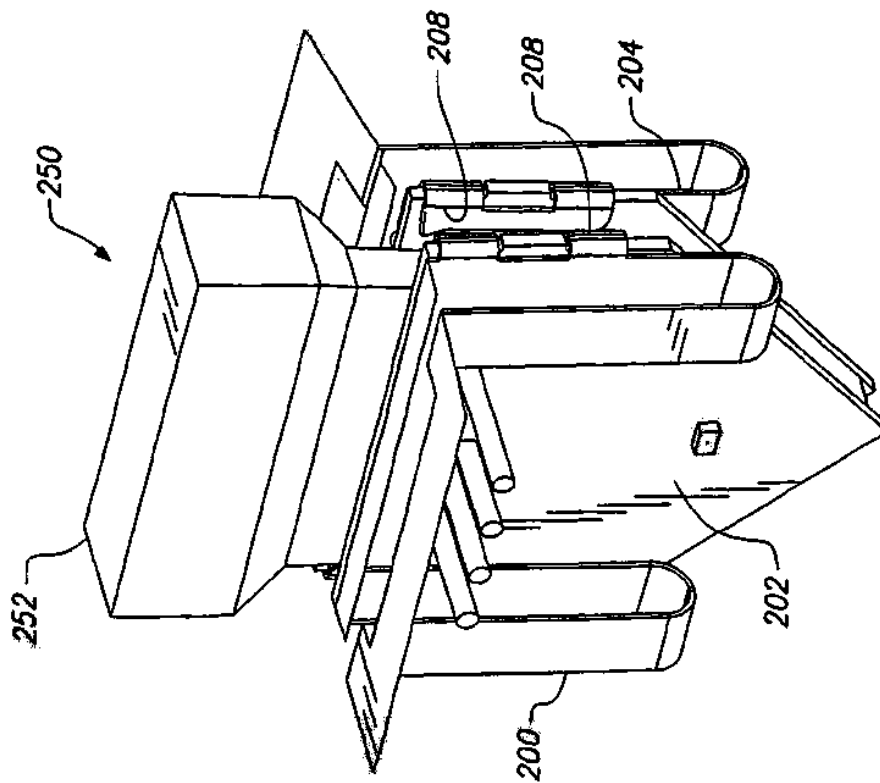
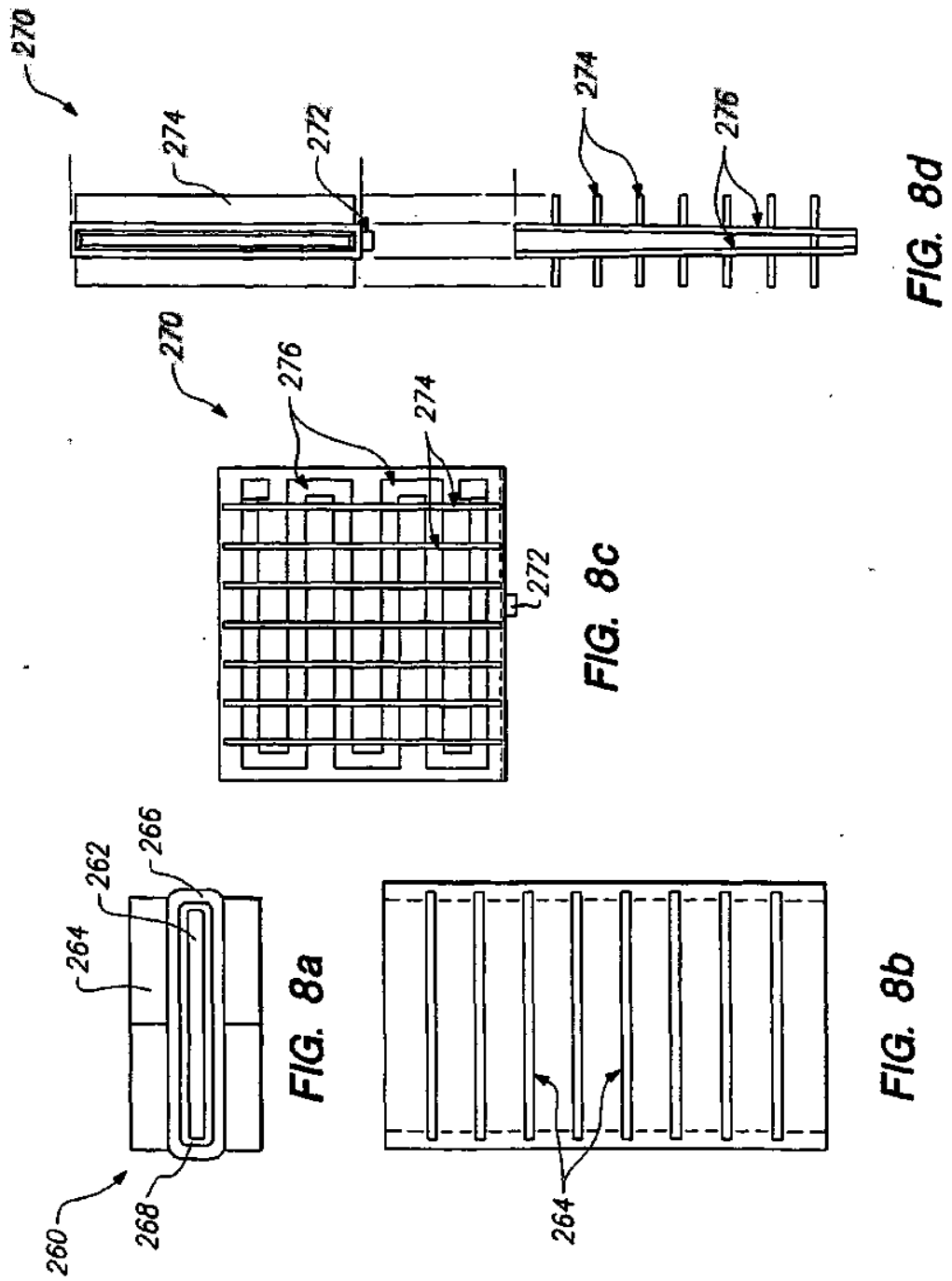
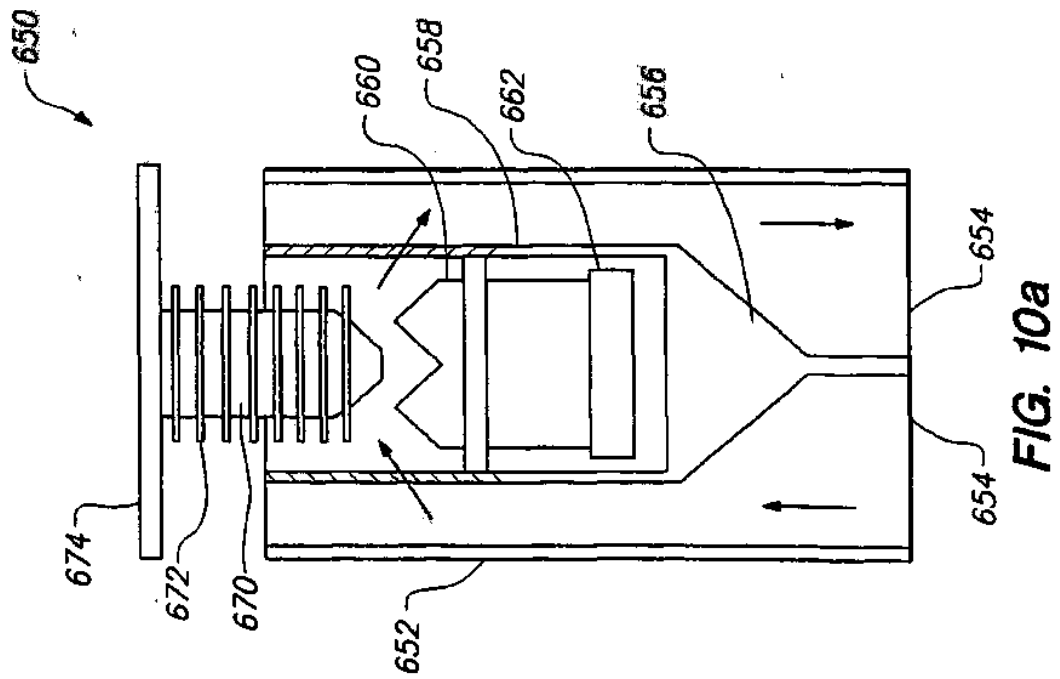
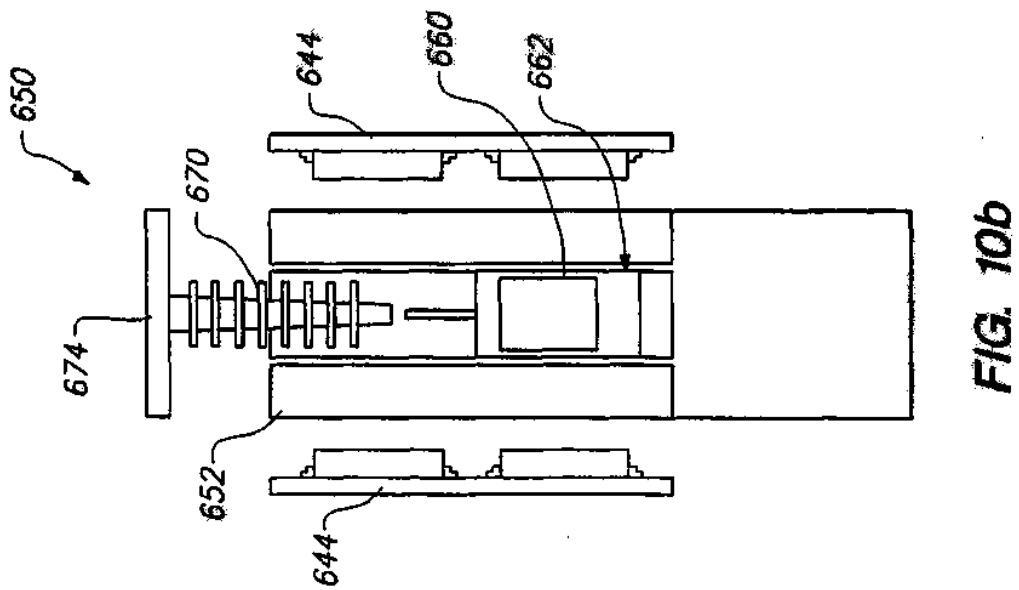


FIG. 7





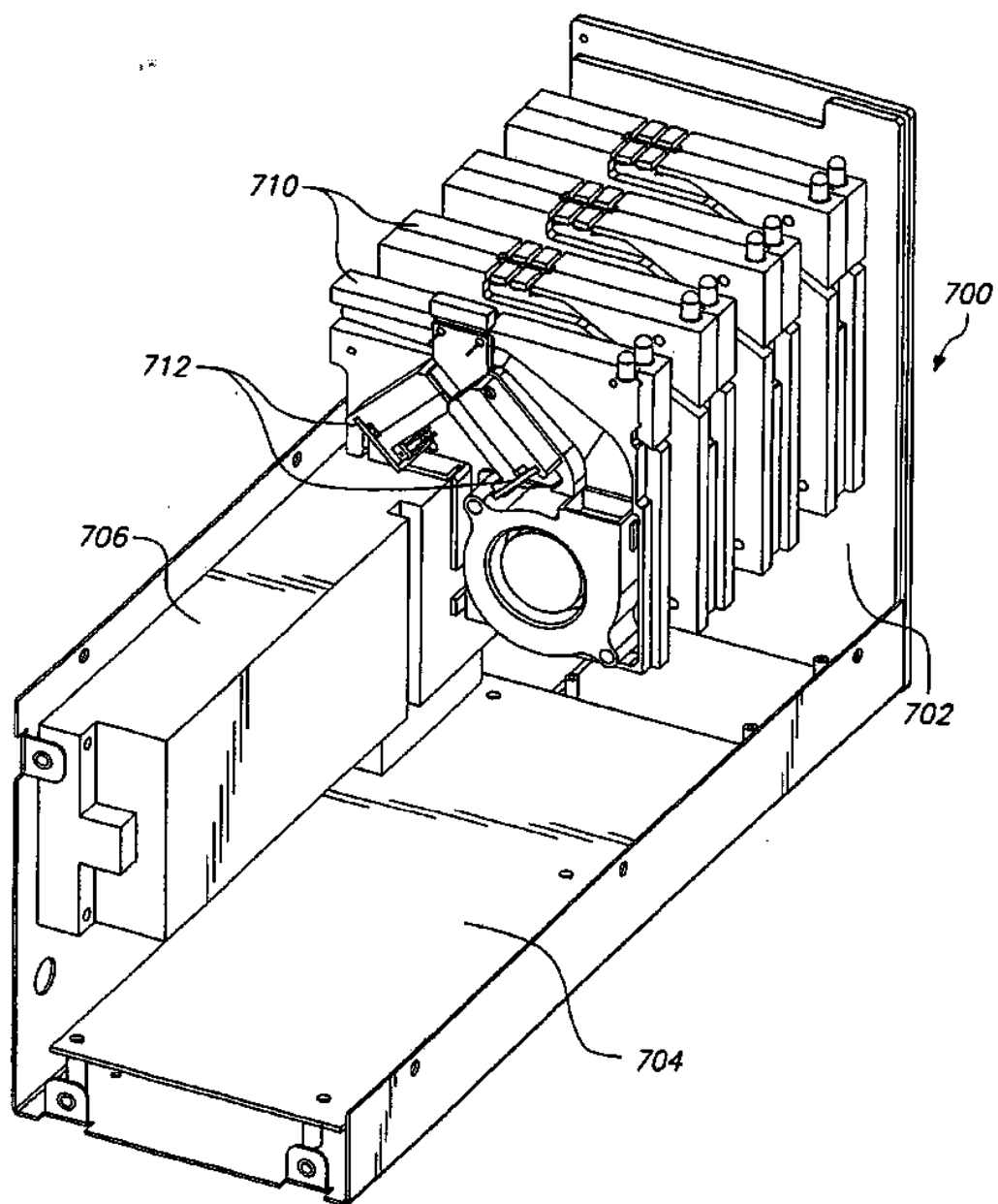


FIG. 11a

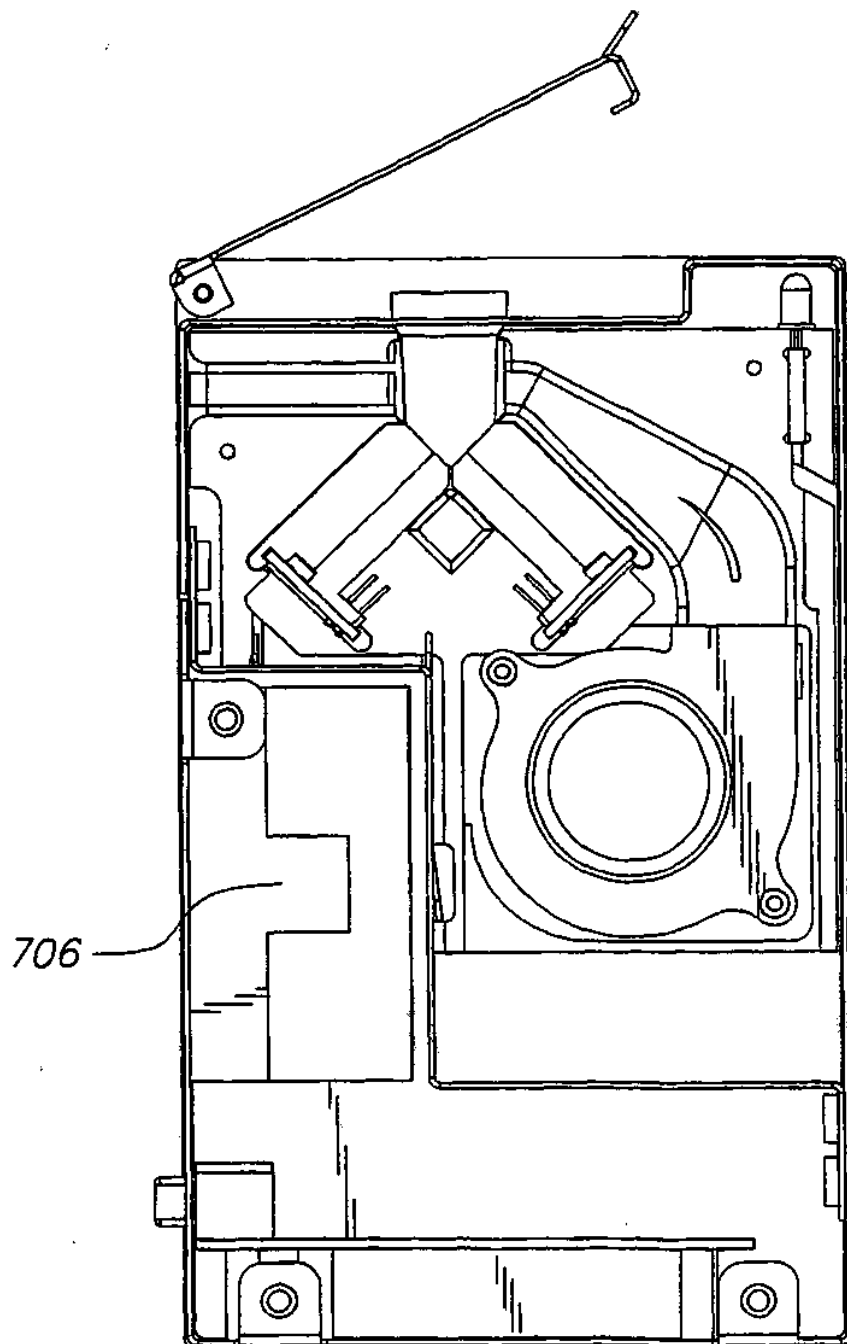


FIG. 11b

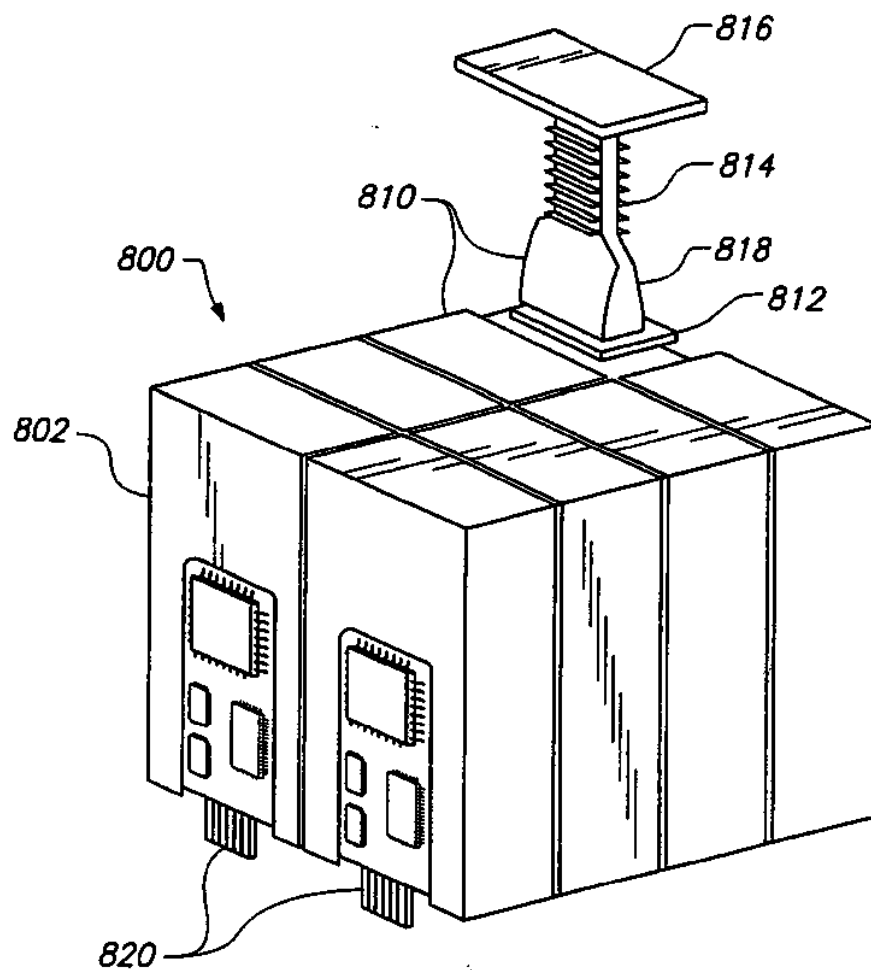


FIG. 11c