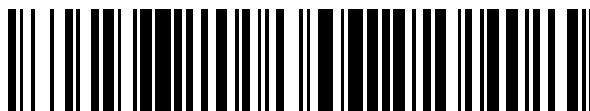


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 563 805**

51 Int. Cl.:

C12M 1/38 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.04.2011** **E 11772265 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.02.2016** **EP 2562247**

54 Título: **Dispositivo de PCR que incluye dos bloques térmicos**

30 Prioridad:

21.04.2011 KR 20110037352

23.04.2010 KR 20100037960

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

16.03.2016

73 Titular/es:

NANOBIOSYS INC. (100.0%)
Rm.1004, Hanshin IT Tower 2-cha, 60-18 Gasan-
dong, Geumcheon-gu
Seoul 153-712, KR

72 Inventor/es:

KIM, SUNG WOO;
KIM, DUCK JOONG;
KIM, SUN JIN;
RYU, HO SUN y
LEE, DONG HOON

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 563 805 T3

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

DESCRIPCIÓN

Dispositivo de PCR que incluye dos bloques térmicos

5 CAMPO TÉCNICO

[0001] La presente invención se refiere a un dispositivo de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que incluye un bloque térmico que se usa para amplificación de ácidos nucleicos.

10 TÉCNICA ANTECEDENTE

[0002] La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica que consiste en calentar y enfriar repetidamente una solución de muestra que incluye ácido nucleico para replicar en cadena una región del ácido nucleico que tiene una secuencia de bases específica y, de este modo, para amplificar exponencialmente el ácido nucleico que tiene la región con la secuencia de bases específica y se usa habitualmente en campos, tales como ciencias de la vida, ingeniería genética y medicina, para análisis y diagnóstico.

[0003] Recientemente, se han desarrollado diversos dispositivos de PCR para realizar la PCR. Un dispositivo de PCR según un ejemplo está equipado con un recipiente que incluye una solución de muestra que incluye ácido nucleico en una cámara de reacción y realiza la PCR calentando y enfriando repetidamente el recipiente. Aunque una estructura global no es complicada, dado que el dispositivo de PCR del ejemplo incluye una cámara de reacción, es necesario incluir circuitos complicados para un control de la temperatura preciso, y un tiempo total para la PCR completa puede prolongarse debido al calentamiento y enfriamiento repetidos de una cámara de reacción. Además, un dispositivo de PCR según otro ejemplo está equipado con una pluralidad de cámaras de reacción a una temperatura para la PCR y realiza la PCR dejando que una solución de muestra, que incluye ácido nucleico, fluya mediante un canal que pasa a través de las cámaras de reacción. Aunque no son necesarios circuitos complicados para control de la temperatura preciso, dado que el dispositivo de PCR de otro ejemplo usa una pluralidad de cámaras de reacción, un largo canal de flujo que pasa a través de las cámaras de reacción que tienen temperaturas alta y baja es necesario y, por lo tanto, una estructura global puede ser complicada, y se requiere un dispositivo de control independiente para controlar un caudal de la solución de muestra, que incluye ácido nucleico, que fluye mediante el canal que pasa a través de las cámaras de reacción.

[0004] Por lo tanto, se desea un dispositivo de PCR que puede tener una estructura global sencilla, minimizar un tiempo de reacción de PCR total, y obtener un rendimiento de PCR fiable.

[0005] El documento US 2006/0046304 A1 se refiere a un dispositivo, sistema y procedimiento térmico para tratar térmicamente un dispositivo de procesamiento de fluido.

[0006] El documento US 2008/0176290 A1 se refiere a un aparato para reacciones químicas de alto rendimiento.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

PROBLEMA TÉCNICO

[0007] La presente invención proporciona un dispositivo de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que muestra excelente rendimiento en una reacción de amplificación de ácido nucleico.

SOLUCIÓN TÉCNICA

[0008] Según la presente invención, se proporciona un dispositivo de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) según la reivindicación 1.

[0009] En las reivindicaciones dependientes se detallan realizaciones preferidas

EFFECTOS VENTAJOSOS

[0010] Dado que se proporciona un dispositivo de PCR que incluye dos bloques térmicos según la presente invención, las reacciones de amplificación de ácido nucleico pueden realizarse eficazmente.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0011]

5

La figura 1 ilustra un dispositivo de PCR que incluye dos bloques térmicos según una realización de la presente invención.

La figura 2 ilustra cada etapa de la reacción de amplificación de ácido nucleico debido al movimiento de un soporte de chip del dispositivo de PCR según una realización de la presente invención.

La figura 3 ilustra etapas de detección de reacción de amplificación de ácido nucleico en tiempo real usando el dispositivo de PCR según una realización de la presente invención.

15 La figura 4 ilustra un chip para PCR instalado en el soporte de chip del dispositivo de PCR según una realización de la presente invención.

La figura 5 ilustra una sección transversal del chip para PCR instalado en el soporte de chip del dispositivo de PCR según una realización de la presente invención que está tratado con un adhesivo de doble cara, resina termoplástica o resina termoendurecible.

MEJOR MODO

[0012]

En lo sucesivo, se describirán realizaciones ejemplares de la presente invención con más detalle con referencia a los dibujos adjuntos.

[0013]

La figura 1 ilustra un dispositivo de PCR 1 que incluye dos bloques térmicos según una realización de la presente invención.

30 [0014] El dispositivo de PCR 1 según una realización de la presente invención incluye un primer bloque térmico 100 dispuesto sobre un sustrato 400; un segundo bloque térmico 200 dispuesto separado del primer bloque térmico 100 sobre el sustrato 400; y un soporte de chip 300 que puede ser movido de izquierda a derecha y/o de arriba abajo por un medio accionador 500 sobre los primer y segundo bloques térmicos 100 y 200, y está equipado con un chip para PCR 900.

35

[0015]

El dispositivo de PCR 1 es un dispositivo que se usa en la PCR (*Polymerase Chain Reaction* = reacción en cadena de la polimerasa) para amplificar un ácido nucleico que tiene una secuencia de bases específica. Por ejemplo, un dispositivo de PCR para amplificación de ADN (ácido desoxirribonucleico) que tiene una secuencia de bases específica realiza tres etapas: desnaturalización, hibridación y extensión, y el ADN que tiene la secuencia de bases específica puede amplificarse exponencialmente repitiendo, por ejemplo, de 20 a 40 ciclos de las tres etapas: la etapa de desnaturalización implica calentar una solución de muestra que incluye ADN bicatenario a una temperatura predeterminada, por ejemplo aproximadamente 95°C, para separar el ADN bicatenario en ADN monocatenario; la etapa de hibridación implica proporcionar cebadores oligonucleotídicos que tienen una secuencia complementaria a la secuencia de bases específica a amplificar a la solución de muestra, enfriar el ADN monocatenario separado junto con los cebadores a una temperatura predeterminada, por ejemplo 55°C, y de este modo unir los cebadores a una secuencia de bases específica del ADN monocatenario, formando de este modo un complejo parcialmente de ADN-cebador; y la etapa de extensión (o amplificación) implica mantener una temperatura de la solución de muestra después de la etapa de hibridación a una temperatura apropiada, por ejemplo 72°C, y de este modo formar ADN bicatenario mediante la acción de ADN polimerasa basándose en cebadores del complejo parcialmente de ADN-cebador. Además, en algunas realizaciones, el dispositivo de PCR puede realizar la etapa de hibridación y la etapa de extensión (o amplificación) al mismo tiempo, y a este respecto, la PCR puede completar un ciclo realizando un proceso de dos etapas que consiste en la etapa de hibridación y la etapa de hibridación y extensión (o amplificación). Por lo tanto, el dispositivo de PCR 1 según una realización de la presente invención se refiere a un dispositivo que incluye módulos para realizar las etapas indicadas anteriormente, y se supone que los módulos no indicados en el presente documento estarían todos incluidos dentro del alcance obvio desvelado en la técnica anterior para realizar PCR.

[0016]

El dispositivo de PCR 1 según una realización de la presente invención incluye el primer bloque térmico 100 dispuesto sobre el sustrato 400 y el segundo bloque térmico 200 dispuesto separado del primer bloque

térmico 100 sobre el sustrato 400.

[0017] El sustrato 400 incluye cualquier material que tenga propiedades físicas y/o químicas que no cambian debido al calentamiento o al mantenimiento de la temperatura del primer bloque térmico 100 y el segundo bloque térmico 200 y mediante el cual el intercambio de calor entre el primer bloque térmico 100 y el segundo bloque térmico 200 no se produce. Por ejemplo, el sustrato 400 puede incluir un material tal como plástico o puede estar formado de dicho material.

[0018] El primer bloque térmico 100 y el segundo bloque térmico 200 están dispuestos para mantener una temperatura para realizar las etapas de desnaturalización, hibridación y extensión (o amplificación) para amplificar ácido nucleico. Por lo tanto, el primer bloque térmico 100 y el segundo bloque térmico 200 pueden proporcionar una temperatura necesaria requerida en cada una de las etapas y pueden incluir diversos módulos para mantener la temperatura o pueden estar conectados de forma accionable a los módulos. Por lo tanto, cuando el soporte de chip 300 equipado con el chip para PCR 900 contacta con una superficie de uno de los primer y segundo bloques térmicos 100 y 200, una solución de muestra en el chip para PCR 900 puede calentarse uniformemente y mantenerse a una temperatura deseada, dado que toda la superficie del primer bloque térmico 100 o el segundo bloque térmico 200 en contacto con el chip para PCR 900 puede calentarse o mantenerse a una temperatura deseada. A diferencia de un dispositivo de PCR convencional que usa un único bloque térmico tiene una velocidad de cambio de temperatura del único bloque térmico en un intervalo de 3 a 7°C por segundo, el dispositivo de PCR 1 que incluye los dos bloques térmicos según una realización de la presente invención puede reducir significativamente un tiempo de PCR, dado que una velocidad de cambio de temperatura de cada uno de los primer y segundo bloques térmicos 100 y 200 puede estar en un intervalo de 20 a 40°C por segundo.

[0019] Un hilo térmico (no mostrado) puede estar dispuesto en cada uno de los primer y segundo bloques térmicos 100 y 200. El hilo térmico puede estar conectado de forma accionable a diversas fuentes de calor para mantener una temperatura para realizar las etapas de desnaturalización, hibridación y extensión (o amplificación) o puede estar conectado de forma accionable a diversos sensores de temperatura para monitorizar una temperatura del hilo térmico. El hilo térmico puede estar dispuesto de forma simétrica en direcciones de arriba abajo y/o de izquierda a derecha basándose en un centro de cada superficie de los primer y segundo bloques térmicos 100 y 200 para mantener uniformemente una temperatura global dentro de los primer y segundo bloques térmicos 100 y 200. Una disposición del hilo térmico simétrica en direcciones de arriba abajo y/o de izquierda a derecha puede variar. Además, calefactores de película delgada (no mostrados) pueden estar dispuestos dentro del primer o el segundo bloque térmico 100 o 200. Los calefactores de película delgada pueden estar dispuestos por separado con una distancia regular en direcciones de arriba abajo y/o de izquierda a derecha basándose en un centro de cada superficie de los primer y segundo bloques térmicos 100 y 200 para mantener uniformemente una temperatura global dentro de los primer y segundo bloques térmicos 100 y 200. Una disposición regular de los calefactores de película delgada en direcciones de arriba abajo y/o de izquierda a derecha puede variar.

[0020] Los primer y segundo bloques térmicos 100 y 200 pueden incluir un material de metal, por ejemplo, pueden incluir un material de aluminio o pueden estar formados de un material de aluminio, para distribución del calor uniforme y transferencia del calor rápida al mismo área.

[0021] El primer bloque térmico 100 puede estar fabricado para mantener una temperatura apropiada para realizar la etapa de desnaturalización, o la etapa de hibridación y extensión (o amplificación). Por ejemplo, el primer bloque térmico 100 del dispositivo de PCR 1 según una realización de la presente invención puede mantener una temperatura de 50 a 100°C, puede mantener una temperatura de 90 a 100°C, preferentemente 95°C, cuando la etapa de desnaturalización se realiza en el primer bloque térmico 100, o puede mantener una temperatura de 55 a aproximadamente 75°C, preferentemente 72°C, cuando la etapa de hibridación y extensión (o amplificación) se realiza en el primer bloque térmico. Sin embargo, la temperatura no está limitada a esto siempre que pueda realizarse la etapa de desnaturalización, o la etapa de hibridación y extensión (o amplificación). El segundo bloque térmico 200 puede fabricarse para mantener una temperatura apropiada para realizar la etapa de desnaturalización o la etapa de hibridación y extensión (o amplificación). Por ejemplo, el segundo bloque térmico 200 del dispositivo de PCR 1 según una realización de la presente invención puede mantener una temperatura de 90 a 100°C, preferentemente 95°C, cuando la etapa de desnaturalización se realiza en el segundo bloque térmico 200, o puede mantener una temperatura de 55 a 75°C, preferentemente 72°C, cuando la etapa de hibridación y extensión (o amplificación) se realiza en el segundo bloque térmico 200. Sin embargo, la temperatura no está limitada a esto siempre que pueda realizarse la etapa de desnaturalización o la etapa de hibridación y extensión (o amplificación). Por lo tanto, según una realización de la presente invención, el primer bloque térmico 100 puede mantener una temperatura de desnaturalización de PCR. Cuando una temperatura de desnaturalización es menor de 90°C, el

ácido nucleico que forma una plantilla para la PCR se desnaturaliza, produciendo una disminución de la eficiencia de la PCR, por lo tanto una eficiencia de PCR puede reducirse o la PCR puede no producirse. Además, cuando una temperatura de desnaturalización es mayor de 100°C, una enzima usada en la PCR puede perder su actividad, por lo tanto la temperatura de desnaturalización puede ser de 90 a 100°C, preferentemente 95°C. Además, según una
 5 realización de la presente invención, el segundo bloque térmico 200 puede mantener una temperatura de hibridación y extensión (o amplificación) de PCR. Cuando la temperatura de hibridación y extensión (o amplificación) es menor de 55°C, la especificidad por el producto de PCR puede reducirse, y cuando la temperatura de hibridación y extensión (o amplificación) es mayor de 74°C, una eficiencia de PCR puede reducirse, dado que una extensión debida a los cebadores no puede producirse, de este modo la temperatura de hibridación y extensión (o
 10 amplificación) puede ser de 55 a 75°C, preferentemente 72°C.

[0022] Los primer y segundo bloques térmicos 100 y 200 pueden estar dispuestos por separado a una distancia predeterminada, de modo que el intercambio de calor entre ellos no pueda producirse. Por consiguiente, dado que el intercambio de calor entre el primer bloque térmico 100 y el segundo bloque térmico 200 no se produce,
 15 el control preciso de la temperatura en la etapa de desnaturalización y la etapa de hibridación y extensión (o amplificación) puede permitirse en una reacción de amplificación de ácido nucleico que puede resultar afectada significativamente por un ligero cambio de temperatura.

[0023] El dispositivo de PCR 1 según una realización de la presente invención incluye un soporte de chip 300
 20 que puede ser movido de izquierda a derecha y/o de arriba abajo por un medio accionador 500 sobre los primer y segundo bloques térmicos 100 y 200, y está equipado con un chip para PCR 900. Además, el chip para PCR 900 puede estar fabricado para contactar con una superficie del primer bloque térmico 100 o el segundo bloque térmico 200 y para contener una solución de muestra que incluye ácido nucleico a amplificar.

[0024] El chip para PCR 900 puede contener una solución de muestra que incluye ácido nucleico, tal como ADN bicatenario, cebadores oligonucleotídicos que tienen una secuencia complementaria a una secuencia de bases específica a amplificar, ADN polimerasa, desoxirribonucleótido trifosfatos (dNTP), o un tampón de reacción de PCR. El chip para PCR 900 puede incluir una unidad de entrada (no mostrada) para introducir la solución de muestra, una
 25 unidad de salida (no mostrada) para extraer la solución de muestra que completó la reacción de amplificación de ácido nucleico, y una cámara (o canal) de reacción (no mostrada) donde se realiza la reacción de amplificación de ácido nucleico de la solución de muestra. Cuando el chip para PCR 900 está en contacto con el primer y el segundo
 30 bloque térmico 100 y 200, el calor del primer y el segundo bloque térmico 100 y 200 es transferido al chip para PCR 900 y, de este modo, la solución de muestra incluida en la cámara (o canal) de reacción del chip para PCR 900 puede calentarse y mantenerse a una temperatura. Además, el chip para PCR 900 puede tener una forma global
 35 plana, pero no está limitado a esto. Además, cuando la reacción de amplificación de ácido nucleico es realizada por el dispositivo de PCR 1, una pared externa del chip para PCR 900 puede tener una forma y estructura para que el chip para PCR 900 se fije en un espacio interno del soporte de chip 300, de modo que el chip para PCR 900 no se disocie del soporte de chip 300. Una descripción detallada del chip para PCR 900 se describirá en lo sucesivo con referencia a las figuras 4 y 5.

[0025] El soporte de chip 300 es un módulo para que el chip para PCR 900 se instale en el dispositivo de PCR 1. Cuando la reacción de amplificación de ácido nucleico es realizada por el dispositivo de PCR 1, una pared
 40 interna del soporte de chip 300 puede tener una forma y estructura para que el chip para PCR 900 se fije a la pared externa del chip para PCR 900 de modo que el chip para PCR 900 no se disocie del soporte de chip 300. El soporte de chip 300 puede estar conectado de forma accionable al medio accionador 500. Además, el chip para PCR 900 puede ser desprendible del soporte de chip 300.

[0026] El medio accionador 500 incluye todos los medios que permiten que el soporte de chip 300 equipado con el chip para PCR 900 se mueva de izquierda a derecha y/o de arriba abajo sobre los primer y segundo bloques
 50 térmicos 100 y 200. A medida que el medio accionador 500 se mueve de izquierda a derecha, el soporte de chip 300 equipado con el chip para PCR 900 puede moverse hacia atrás y adelante entre el primer bloque térmico 100 y el segundo bloque térmico 200, y a medida que el medio accionador 500 se mueve de arriba abajo, el soporte de chip 300 equipado con el chip para PCR 900 puede estar en contacto con y estar separado del primer y el segundo
 55 bloque térmico 100 y 200. Tal como se muestra en la figura 1, el medio accionador 500 del dispositivo de PCR 1 según una realización de la presente invención incluye un raíl 510 que se extiende en la dirección de izquierda a derecha y un miembro de conexión 520 que está dispuesto para permitir un movimiento deslizante en la dirección de izquierda a derecha mediante el raíl 510 y permitir un movimiento deslizante en la dirección de arriba abajo, en el que el soporte de chip 300 está dispuesto en un extremo del miembro de conexión 520. El movimiento de izquierda a derecha y/o de arriba abajo del medio accionador 500 puede estar controlado por un medio de control (no

mostrado) dispuesto de forma accionable dentro o fuera del dispositivo de PCR 1, y el medio de control puede controlar el contacto y la separación entre el soporte de chip 300 equipado con el chip para PCR 900 para la etapa de desnaturalización y la etapa de hibridación y extensión (o amplificación) de PCR y el primer o el segundo bloque térmico 100 o 200.

5

[0027] La figura 2 ilustra cada etapa de la reacción de amplificación de ácido nucleico debida al movimiento del soporte de chip del dispositivo de PCR según una realización de la presente invención.

[0028] La reacción de amplificación de ácido nucleico debida al dispositivo de PCR 1 según una realización de la presente invención tiene las siguientes etapas: en primer lugar, una solución de muestra que incluye ácido nucleico, tal como ADN bicatenario, cebadores oligonucleotídicos que tienen una secuencia complementaria a una secuencia de bases específica a amplificar, ADN polimerasa, dNTP, o un tampón de reacción de PCR, se introduce en el chip para PCR 900, el chip para PCR 900 puede estar instalado en el soporte de chip 300. A continuación o al mismo tiempo, el primer bloque térmico 100 puede calentarse hasta una temperatura para la etapa de desnaturalización, por ejemplo 90 a 100°C, y mantenerse a la temperatura, preferentemente calentarse hasta 95°C y mantenerse a la temperatura. El segundo bloque térmico 200 puede calentarse hasta una temperatura para la etapa de hibridación y extensión (o amplificación), por ejemplo de 55 a 75°C, y mantenerse a la temperatura, preferentemente calentarse hasta 72°C y mantenerse a la temperatura.

[0029] A continuación, el miembro de conexión 520 del medio accionador 500 puede estar controlado para mover el chip para PCR 900 hacia abajo, de este modo el soporte de chip 300 equipado con el chip para PCR 900 puede estar en contacto con el primer bloque térmico 100 para realizar una primera etapa de desnaturalización (etapa x) de PCR.

[0030] Posteriormente, el miembro de conexión 520 del medio accionador 500 puede estar controlado para mover el chip para PCR 900 hacia arriba, de este modo el soporte de chip 300 equipado con el chip para PCR 900 puede estar separado del primer bloque térmico 100 para finalizar la primera etapa de desnaturalización de PCR, el miembro de conexión 520 del medio accionador 500 puede estar controlado para realizar una etapa para mover el chip para PCR 900 por encima del segundo bloque térmico 200 (etapa y).

30

[0031] A continuación, el miembro de conexión 520 del medio accionador 500 puede estar controlado para mover el chip para PCR 900 hacia abajo, de este modo el soporte de chip 300 equipado con el chip para PCR 900 puede estar en contacto con el segundo bloque térmico 100 para realizar la primera etapa de hibridación y extensión (o amplificación) de PCR (etapa z).

35

[0032] Por último, el miembro de conexión 520 del medio accionador 500 puede estar controlado para mover el chip para PCR 900 hacia arriba, de este modo el soporte de chip 300 equipado con el chip para PCR 900 puede separarse del segundo bloque térmico 100 para finalizar la primera etapa de hibridación y extensión (o amplificación) de PCR, el miembro de conexión 520 del medio accionador 500 puede estar controlado para mover el chip para PCR 900 por encima del primer bloque térmico 100 y repetir las etapas x, y y z, realizando de este modo la reacción de amplificación de ácido nucleico (etapa circulante).

40

[0033] La figura 3 ilustra etapas de monitorización de la reacción de amplificación de ácido nucleico en tiempo real usando el dispositivo de PCR según una realización de la presente invención.

45

[0034] En el dispositivo de PCR 1 según una realización de la presente invención, una fuente de luz 700 está interpuesta, además, entre los primer y segundo bloques térmicos 100 y 200, y una unidad de detección de luz 800 para detectar la luz emitida desde la fuente de luz 700 está dispuesta, además, sobre el soporte de chip 300; o la unidad de detección de luz 800 para detectar la luz emitida desde la fuente de luz 700 está interpuesta, además, entre los primer y segundo bloques térmicos 100 y 200, y la fuente de luz 700 está dispuesta, además, sobre el soporte de chip 300. Además, la unidad de detección de luz 800 puede estar dispuesta sobre el medio accionador 500, y una unidad de transmisión 530 para transmitir la luz emitida desde la fuente de luz 700 puede estar dispuesta en el medio accionador 500. Además, el chip para PCR 900 puede ser un material transmisor de luz, particularmente un material plástico transmisor de luz. La descripción detallada del chip para PCR 900 se describirá en lo sucesivo con referencia a las figuras 4 y 5.

50

[0035] Durante la reacción de amplificación de ácido nucleico debida al dispositivo de PCR 1 según una realización de la presente invención, un grado del ácido nucleico que está siendo amplificado en el chip para PCR 900 puede detectarse en tiempo real disponiendo la fuente de luz 700 y la unidad de detección de luz 800. Para

detectar el grado del ácido nucleico que está siendo amplificado en el chip para PCR, un material fluorescente independiente puede añadirse además a la solución de muestra que se introduce en el chip para PCR 900. La fuente de luz 700 está dispuesta para distribuirse sobre el espacio independiente entre los primer y segundo bloques térmicos 100 y 200 lo más amplio posible y está dispuesta para emitir posiblemente la misma luz. La fuente de luz 700 puede estar conectada y dispuesta para ser accionable con una lente (no mostrada) que recoge la luz emitida desde la fuente de luz 700 y un filtro de luz (no mostrado) que filtra la luz a un intervalo de longitudes de onda particulares.

[0036] Durante la reacción de amplificación de ácido nucleico debida al dispositivo de PCR 1 según una realización de la presente invención, las etapas de detección del grado del ácido nucleico que está siendo amplificado en el chip para PCR 900 en tiempo real son las siguientes. Cuando el miembro de conexión 520 del medio accionador 500 está controlado para mover el chip para PCR 900 desde encima del primer bloque térmico 100 hasta encima del segundo bloque térmico 200 después de completar la primera etapa de desnaturalización de la PCR, o cuando el miembro de conexión 520 del medio accionador 500 está controlado para mover el chip para PCR 900 desde encima del segundo bloque térmico 200 hasta encima del primer bloque térmico 100 después de completar la primera etapa de hibridación y extensión (o amplificación) de la PCR, el miembro de conexión 520 del medio accionador 500 está controlado para detener el soporte de chip 300 equipado con el chip para PCR 900 en el espacio independiente entre los primer y segundo bloques térmicos 100 y 200. A continuación, luz es emitida desde la fuente de luz 700, la luz emitida se transmite a través del chip para PCR 900 que es transparente a la luz, particularmente la cámara (o canal) de reacción del chip para PCR 900, y en este caso, una señal luminosa generada por amplificación del ácido nucleico dentro de la cámara (o canal) de reacción es detectada por la unidad de detección 800. En este caso, la luz transmitida a través del chip para PCR 900 que es transparente a la luz puede llegar a la unidad de detección 800 mediante transmisión a través del medio accionador 500, particularmente la unidad de transmisión 530 dispuesta en el raíl 510.

[0037] Por lo tanto, con respecto al dispositivo de PCR 1 según una realización de la presente invención, una cantidad de ácido nucleico diana incluida en una muestra de reacción inicial puede medirse y analizarse en tiempo real monitorizando los resultados de reacción debidos a la amplificación del ácido nucleico (al que está unido el material fluorescente) en la cámara (o canal) de reacción en tiempo real mientras cada una de las etapas de circulación de la PCR continúa.

[0038] La figura 4 ilustra el chip para PCR 900 que está instalado en el soporte de chip 300 del dispositivo de PCR 1 según una realización de la presente invención.

[0039] El chip para PCR 900 puede contener una solución de muestra que incluye ácido nucleico, tal como ADN bicatenario, cebadores oligonucleotídicos que tienen una secuencia complementaria a una secuencia de bases específica a amplificar, ADN polimerasa, dNTP, o un tampón de reacción de PCR. El chip para PCR 900 puede incluir una unidad de entrada 931 para introducir la solución de muestra, una unidad de salida 932 para extraer la solución de muestra que completó la reacción de amplificación de ácido nucleico, y una o más cámaras (o canales) de reacción 921 en la que está contenida la solución de muestra que incluye ácido nucleico a amplificar. Cuando el chip para PCR 900 está en contacto con el primer bloque térmico 100 o segundo bloque térmico 200, el calor del primer bloque térmico 100 o el segundo bloque térmico 200 es transferido al chip para PCR 900, y de este modo la solución de muestra incluida en la cámara (o canal) de reacción del chip para PCR 900 puede calentarse o enfriarse y mantenerse a una temperatura constante. Además, el chip para PCR 900 puede tener una forma global plana, pero no está limitado a esto. Además, el chip para PCR 900 instalado en el soporte de chip 300 puede estar dispuesto en contacto con el primer o el segundo bloque térmico 100 o 200. De este modo, según una realización de la presente invención, el hecho de que el chip para PCR 900 esté dispuesto sobre una superficie del primer o el segundo bloque térmico 100 o 200 puede indicar que el chip para PCR 900 instalado en el soporte de chip 300 está dispuesto en contacto con el primer o el segundo bloque térmico 100 o 200. Además, el chip para PCR 900 puede estar formado de un material transmisor de luz, preferentemente un material plástico transmisor de luz. Cuando se usa plástico para fabricar el chip para PCR 900, una eficiencia de transferencia de calor puede incrementarse controlando solamente un grosor del plástico, y un coste de fabricación puede reducirse, dado que el proceso de fabricación es sencillo. Además, dado que el chip para PCR 900 puede incluir propiedades de transmisión de luz como un todo, la luz puede ser irradiada directamente mientras el chip para PCR 900 está dispuesto sobre una superficie del primer o el segundo bloque térmico 100 o 200, de este modo, la amplificación de ácido nucleico y un grado de la amplificación pueden medirse y analizarse en tiempo real.

[0040] Una primera placa 910 está dispuesta sobre una segunda placa 920. Dado que la primera placa 910 está dispuesta en contacto con una superficie inferior de la segunda placa 920, un canal de abertura pasante 921

puede formar un tipo de cámara de PCR. Además, la primera placa 910 puede estar formada de diversos materiales, preferentemente un material seleccionado entre el grupo constituido por polidimetilsiloxano (PDMS), copolímero de olefina cíclica (COC), polimetilmetacrilato (PMMA), policarbonato (PC), carbonato de polipropileno (PPC), poliéter sulfona (PES), polietilentereftalato (PET), y una combinación de los mismos. Además, una superficie superior de la primera placa 910 está tratada con un material hidrófilo 922 de modo que la PCR pueda realizarse fácilmente. Una única capa que incluye el material hidrófilo 922 puede estar formado sobre la primera placa 910 debido al tratamiento del material hidrófilo 922. El material hidrófilo puede ser diversos materiales, preferentemente un material seleccionado entre el grupo constituido por un grupo carboxilo (-COOH), grupo amina (-NH₂), grupo hidroxilo (-OH), y grupo sulfona (-SH), y el tratamiento del material hidrófilo 922 puede realizarse usando un procedimiento conocido en la técnica.

[0041] La segunda placa 920 está dispuesta sobre la primera placa 910. La segunda placa 920 incluye el canal de abertura pasante 921. Los canales de abertura pasante 921 pueden estar conectados a una parte correspondiente a una unidad de entrada de abertura pasante 931 y una unidad de salida de abertura pasante 932 y forman un tipo de cámara de PCR. Por lo tanto, la PCR se realiza después de que la solución de muestra a amplificar se introduzca en el canal de abertura pasante 921. Además, pueden usarse dos o más canales de abertura pasante 921 dependiendo de un propósito de uso y el alcance del dispositivo de PCR 1 según una realización de la presente invención. Con referencia a la figura 4, se ilustran 6 canales de abertura pasante 921. Además, la segunda placa 920 puede estar formada de diversos materiales, preferentemente un material de resina termoplástica o resina termoendurecible seleccionado entre el grupo constituido por polimetilmetacrilato (PMMA), policarbonato (PC), copolímero de olefina cíclica (COC), poliamida (PA), polietileno (PE), polipropileno (PP), éter de polifenileno (PPE), poliestieno (PS), polioximetileno (POM), polieteretercetona (PEEK), politetrafluoroetileno (PTFE), cloruro de polivinilo (PVC), fluoruro de polivinilideno (PVDF), polibutylentereftalato (PBT), etileno-propileno fluorado (FEP), perfluoro-alcoialcano (PFA), y una combinación de los mismos. Además, un grosor de la segunda placa 920 puede variar, y puede seleccionarse entre 100 µm y 200 µm. Además, una anchura y una longitud del canal de abertura pasante 921 puede variar, preferentemente una anchura del canal de abertura pasante 921 puede seleccionarse entre 0,5 mm y 3 mm, y una longitud del canal de abertura pasante 921 puede seleccionarse entre 20 mm y 40 mm. Además, una pared interna de la segunda placa 920 puede estar revestida con un material tal como material a base de silano o albúmina de suero bovino (BSA), y el revestimiento puede realizarse usando un procedimiento conocido en la técnica.

[0042] La tercera placa 930 está dispuesta sobre la segunda placa 920. La tercera placa 930 incluye una unidad de entrada de abertura pasante 931, que está formada con respecto a una parte del canal de abertura pasante 921 formado en la segunda placa 920, y la unidad de salida de abertura pasante 932, que está formada con respecto a la otra parte del canal de abertura pasante 921. La unidad de entrada de abertura pasante 931 es una región donde se introduce la solución de muestra que incluye el ácido nucleico a amplificar. La unidad de salida de abertura pasante 932 es una región donde la solución de muestra es extraída después de completar la PCR. De este modo, la tercera placa 930 cubre el canal de abertura pasante 921 formado en la segunda placa 920 que se describirá en el presente documento, y la unidad de entrada de abertura pasante 931 y la unidad de salida de abertura pasante 932 sirven como una unidad de entrada y una unidad de salida de los canales de abertura pasante 921. Además, la tercera placa 930 puede estar formada de diversos materiales, preferentemente un material seleccionado entre el grupo constituido por polidimetilsiloxano (PDMS), copolímero de olefina cíclica (COC), polimetilmetacrilato (PMMA), policarbonato (PC), carbonato de polipropileno (PPC), poliéter sulfona (PES), polietilentereftalato (PET), y una combinación de los mismos. Aunque un tamaño de la unidad de entrada de abertura pasante 931 puede variar, preferentemente un diámetro de la unidad de entrada de abertura pasante 931 puede seleccionarse entre 1,0 mm y 3,0 mm. Además, aunque un tamaño de la unidad de salida de abertura pasante 932 puede variar, preferentemente un diámetro de la unidad de salida de abertura pasante 932 puede seleccionarse entre 1,0 mm y 1,5 mm. Además, la unidad de entrada de abertura pasante 931 y la unidad de salida de abertura pasante 932 incluyen medios de cubierta independientes (no mostrados), y, por lo tanto, puede prevenirse la fuga de la solución de muestra mientras la PCR está siendo realizada para la solución de muestra en el canal de abertura pasante 921. Los medios de cubierta pueden estar formados en diversas formas, tamaños o materiales. Además, un grosor de la tercera placa puede variar, preferentemente puede seleccionarse entre 0,1 mm y 2,0 mm. Además, pueden usarse dos o más unidades de entrada de abertura pasante 931 y unidades de salida de abertura pasante 932.

[0043] La figura 5 ilustra una sección transversal del chip para PCR 900 instalado en el soporte de chip 300 del dispositivo de PCR según una realización de la presente invención que está tratado con un adhesivo de doble cara, resina termoplástica o resina termoendurecible.

[0044] El chip para PCR 900 puede fabricarse fácilmente mediante un procedimiento que incluye proporcionar la tercera placa 930 formando la unidad de entrada de abertura pasante 931 y la unidad de salida de abertura pasante 932 a través de un proceso mecánico; proporcionar la segunda placa 920 formando los canales de abertura pasante 921 en una plancha que tiene un tamaño correspondiente a la superficie inferior de la tercera placa 930 desde la región correspondiente a la unidad de entrada de abertura pasante 931 de la tercera placa 930 hasta la región correspondiente a la unidad de salida de abertura pasante 932 de la tercera placa 930 mediante un proceso mecánico; proporcionar la primera placa 910 formando una superficie tratada con el material hidrófilo 922 a través de un proceso de tratamiento superficial sobre una superficie superior de una plancha que tiene un tamaño correspondiente a la superficie inferior de la segunda placa 920; y unir la superficie inferior de la tercera placa 930 a la superficie superior de la segunda placa 920 a través de un proceso de unión, y la superficie inferior de la segunda placa 920 a la superficie superior de la primera placa 910 a través de un proceso de unión.

[0045] La unidad de entrada de abertura pasante 931 y la unidad de salida de abertura pasante 932 de la tercera placa 930, y el canal de abertura pasante 921 de la segunda placa 920 pueden formarse usando un procedimiento de fabricación seleccionado entre el grupo constituido por moldeo por inyección, gofrado en caliente, colada y ablación por láser. Además, el material hidrófilo 922 sobre la superficie de la primera placa 910 puede tratarse mediante un procedimiento seleccionado entre el grupo constituido por un tratamiento con plasma de oxígeno-argón, tratamiento por descarga en corona, y un revestimiento tensioactivo, o un procedimiento conocido en la técnica. Además, la superficie inferior de la tercera placa 930 y la superficie superior de la segunda placa 920, y la superficie inferior de la segunda placa 920 y la superficie superior de la primera placa 910 pueden unirse usando unión térmica, soldadura ultrasónica, o proceso de unión con disolvente, o siguiendo un procedimiento conocida en la técnica. Una cinta de doble cara, resina termoplástica o resina termoendurecible 500 puede tratarse entre la tercera placa 930 y la segunda placa 920, y entre la segunda placa 920 y la tercera placa 910.

25 Ejemplo

[0046] Un dispositivo de PCR de otra compañía que se usa habitualmente y el dispositivo de PCR según una realización de la presente invención mostrada en la figura 3 se usaron para comparar y analizar los resultados de realizar una reacción de amplificación de ácido nucleico usando cada uno de los dispositivos. El dispositivo de PCR de otra compañía era el LightCycler 1.5 disponible de ROCHE Co., que está construido de un bloque térmico.

[0047] Para fiabilidad de los resultados de la reacción de amplificación de ácido nucleico, una solución de muestra de un control positivo y una solución de muestra de un control negativo se prepararon, cada una. Para el control positivo, se preparó la solución de muestra de aproximadamente 60 µl incluyendo 30 µl de 2X tampón SYBR green, 4,4 µl (50 ng/20 µl) de ADNc plantilla bicatenario, pares de cebadores que se unen de forma complementaria a una secuencia de bases específica, particularmente 6 µl (1 pmol) de cebadores directos, 6 µl (1 pmol) de cebadores inversos, y 13,6 µl de agua destilada, y para el control negativo, se preparó la solución de muestra de aproximadamente 60 µl incluyendo 30 µl de 2X tampón SYBR green y 30 µl de agua destilada. Respecto a un estándar y un tamaño del dispositivo de PCR según una realización de la presente invención diferente del dispositivo de PCR de otra compañía, aproximadamente 30 µl de la solución de muestras se introdujeron en un chip para PCR instalado en el dispositivo de PCR de otra compañía, y aproximadamente 5 µl de la solución de muestras se introdujeron en un chip de PCR instalado en el dispositivo de PCR según una realización de la presente invención.

[0048] En las condiciones experimentales indicadas anteriormente, 20 ciclos de PCR se realizaron en primer lugar usando el dispositivo de PCR según una realización de la presente invención. Una temperatura del primer bloque térmico se calentó hasta y se mantuvo a 95°C, se le permitió variar en un intervalo de 90 a 100°C, y una temperatura del segundo bloque térmico se calentó hasta y se mantuvo a 72°C, se le permitió variar en un intervalo de 55 a 75°C. La solución de muestras del control positivo y el control negativo se introdujeron en el chip para PCR, y el chip para PCR se instaló en el soporte de chip del dispositivo de PCR. A continuación, se hizo funcionar el dispositivo de PCR. La etapa de desnaturalización se realizó durante aproximadamente 10 segundos, posteriormente la etapa de hibridación y extensión (o amplificación) se realizó durante aproximadamente 10 segundos, y un valor de detección fluorescente debido a la amplificación del ácido nucleico se midió después de cada ciclo de cada etapa. Como resultado, los valores de detección fluorescente mostraron una curva mantenida en incremento después de 5 minutos desde el punto de partida del funcionamiento del dispositivo de PCR. Además, en las condiciones experimentales, se realizaron 20 ciclos de PCR usando el dispositivo de PCR de otra compañía. Como resultado, se requirieron 30 o más minutos para alcanzar los valores de detección fluorescentes conseguidos por el dispositivo de PCR según una realización de la presente invención.

REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (1) que comprende:
 - 5 un primer bloque térmico (100) dispuesto sobre un sustrato (400);
un segundo bloque térmico (200) dispuesto independiente del primer bloque térmico sobre el sustrato (400);
un soporte de chip (300) que puede ser movido de izquierda a derecha y/o de arriba abajo por un medio accionador
10 (500) sobre los primer y segundo bloques térmicos, y está equipado con un chip (900) para PCR, en el que el chip para PCR es desprendible del soporte de chip (300),
en el que el chip (900) para PCR está fabricado para contactar con una superficie del primer bloque térmico (100) o el segundo bloque térmico (200) y para contener una solución de muestra que incluye ácido nucleico a amplificar,
15 **caracterizado porque** una fuente de luz (700) está interpuesta, además, entre los primer y segundo bloques térmicos, y una unidad de detección de luz (800) para detectar la luz emitida desde la fuente de luz (700) está dispuesta, además, encima del soporte de chip (300); o la unidad de detección de luz (800) para detectar la luz emitida desde la fuente de luz (700) está interpuesta, además, entre los primer y segundo bloques térmicos, y la
20 fuente de luz (700) está dispuesta, además, encima del soporte de chip (300).
2. El dispositivo de PCR (1) de la reivindicación 1, en el que un hilo térmico está dispuesto en cada uno de los primer y segundo bloques térmicos.
- 25 3. El dispositivo de PCR (1) de la reivindicación 2, en el que el hilo térmico está dispuesto de forma simétrica en direcciones de arriba abajo y/o de izquierda a derecha basándose en un centro de cada superficie de los primer y segundo bloques térmicos para mantener uniformemente una temperatura global dentro del primer o el segundo bloque térmico.
- 30 4. El dispositivo de PCR (1) de la reivindicación 1, en el que los primer y segundo bloques térmicos (100, 200) están fabricados para mantener una temperatura de desnaturalización de la PCR.
5. El dispositivo de PCR (1) de la reivindicación 4, en el que la temperatura de desnaturalización es de aproximadamente 90 a aproximadamente 100°C.
- 35 6. El dispositivo de PCR (1) de la reivindicación 1, en el que los primer y segundo bloques térmicos (100, 200) están fabricados para mantener una temperatura de hibridación y extensión (o amplificación) de la PCR.
7. El dispositivo de PCR (1) de la reivindicación 6, en el que la temperatura de hibridación y extensión (o
40 amplificación) es de aproximadamente 55 a aproximadamente 75°C.
8. El dispositivo de PCR (1) de la reivindicación 1, en el que los primer y segundo bloques térmicos (100, 200) están dispuestos por separado a una distancia predeterminada, de modo que el intercambio de calor entre ellos no se produce.
- 45 9. El dispositivo de PCR (1) de la reivindicación 1, en el que el medio accionador (500) comprende;
un raíl (510) que se extiende en la dirección de izquierda a derecha; y un miembro de conexión (520) que está
dispuesto para permitir un movimiento deslizante en la dirección de izquierda a derecha mediante el raíl (510) y
50 permite un movimiento deslizante en la dirección de arriba abajo,
en el que el soporte de chip (300) está dispuesto en un extremo del miembro de conexión (520).
10. El dispositivo de PCR (1) de la reivindicación 1, en el que el chip (900) para PCR es un material
55 plástico transmisor de luz.
11. El dispositivo de PCR (1) de la reivindicación 1, en el que el chip para PCR (900) comprende:
una primera placa (910);

una segunda placa (920) que está dispuesta sobre la primera placa (910) y comprende canales de abertura pasante (921); y

5 una tercera placa (930) que está dispuesta sobre la segunda placa (920) y comprende una unidad de entrada de abertura pasante (931) que está formada con respecto a una parte del canal de abertura pasante formado,

y una unidad de salida de abertura pasante (932) que está formada con respecto a la otra parte del canal de abertura pasante.

10

12. El dispositivo de PCR (1) de la reivindicación 11, en el que la primera placa (910) y la tercera placa (930) comprenden un material seleccionado entre el grupo constituido por polidimetilsiloxano (PDMS), copolímero de olefina cíclica (COC), polimetilmetacrilato (PMMA), policarbonato (PC), carbonato de polipropileno (PPC), poliéter sulfona (PES), polietilentereftalato (PET), y una combinación de los mismos, y la segunda placa comprende un

15

material de resina termoplástica o resina termoendurecible seleccionado entre el grupo constituido por polimetilmetacrilato (PMMA), policarbonato (PC), copolímero de olefina cíclica (COC), poliamida (PA), polietileno (PE), polipropileno (PP), éter de polifenileno (PPE), poliestierno (PS), polioximetileno (POM), polieteretercetona (PEEK), politetrafluoroetileno (PTFE), cloruro de polivinilo (PVC), fluoruro de polivinilideno (PVDF), polibutylentereftalato (PBT), etileno-propileno fluorado (FEP), perfluoro-alcoxialcano (PFA), y una combinación de los

20

mismos.

13. El dispositivo de PCR (1) de la reivindicación 11, en el que un diámetro de la unidad de entrada de abertura pasante (931) de la tercera placa (930) se selecciona entre aproximadamente 1,0 mm y aproximadamente 3,0 mm, un diámetro de la unidades de salida de abertura pasante (932) se selecciona entre aproximadamente 1,0

25

mm y aproximadamente 1,5 mm, un grosor de la tercera placa (930) se selecciona entre aproximadamente 0,1 mm y aproximadamente 2 mm, un grosor de la segunda placa (920) se selecciona entre aproximadamente 100 mm y aproximadamente 200 mm, una anchura de los canales de abertura pasante (921) se selecciona entre aproximadamente 0,5 mm y aproximadamente 3 mm, y una longitud del canal de abertura pasante (921) se selecciona entre aproximadamente 20 mm y aproximadamente 40 mm.

30

14. El dispositivo de PCR (1) de la reivindicación 10, en el que una unidad de transmisión (530) para transmitir la luz emitida desde la fuente de luz (700) está dispuesta en el medio accionador (500).

FIG. 1

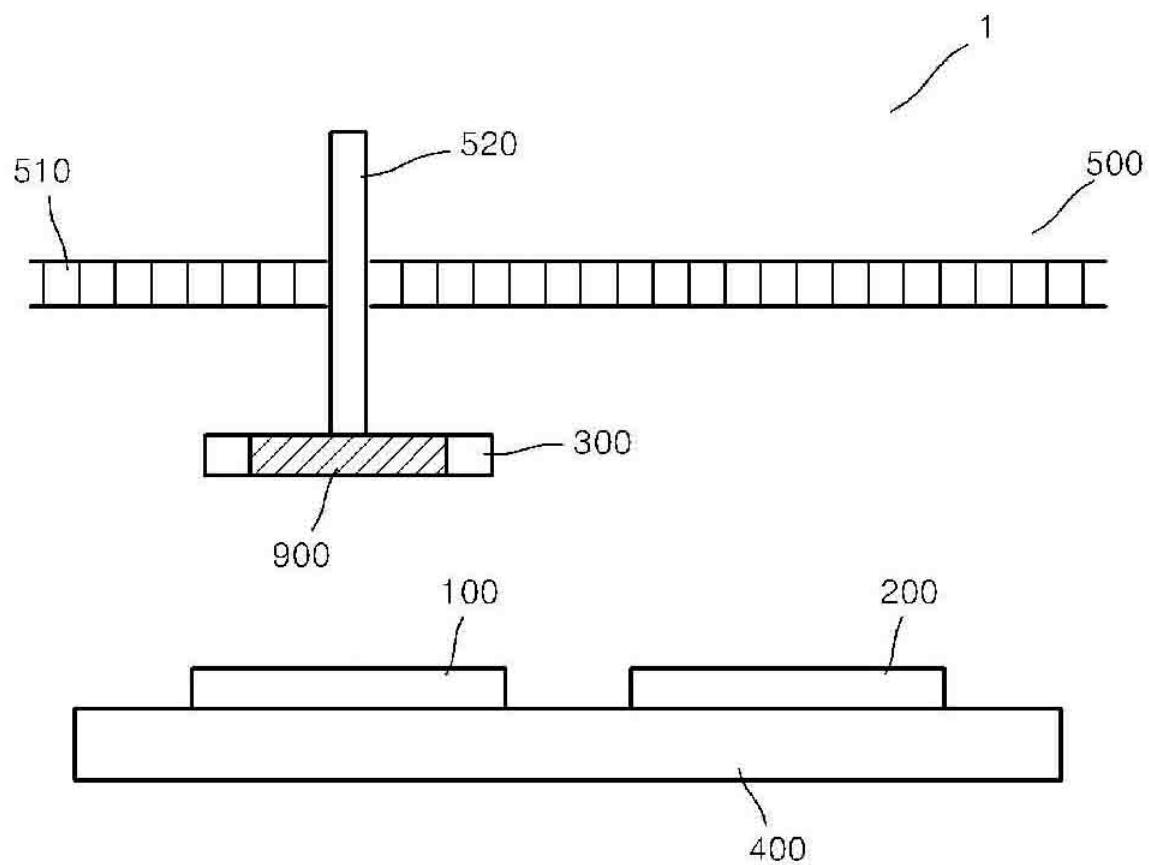


FIG. 2

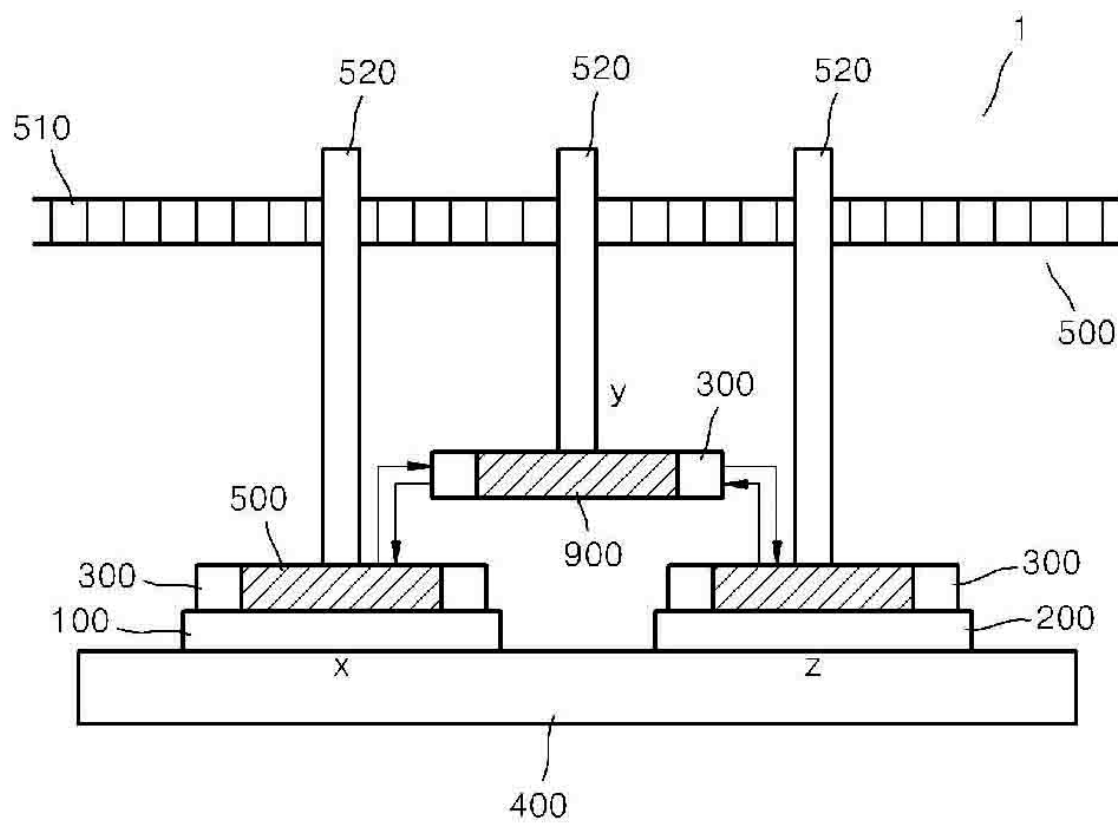


FIG. 3

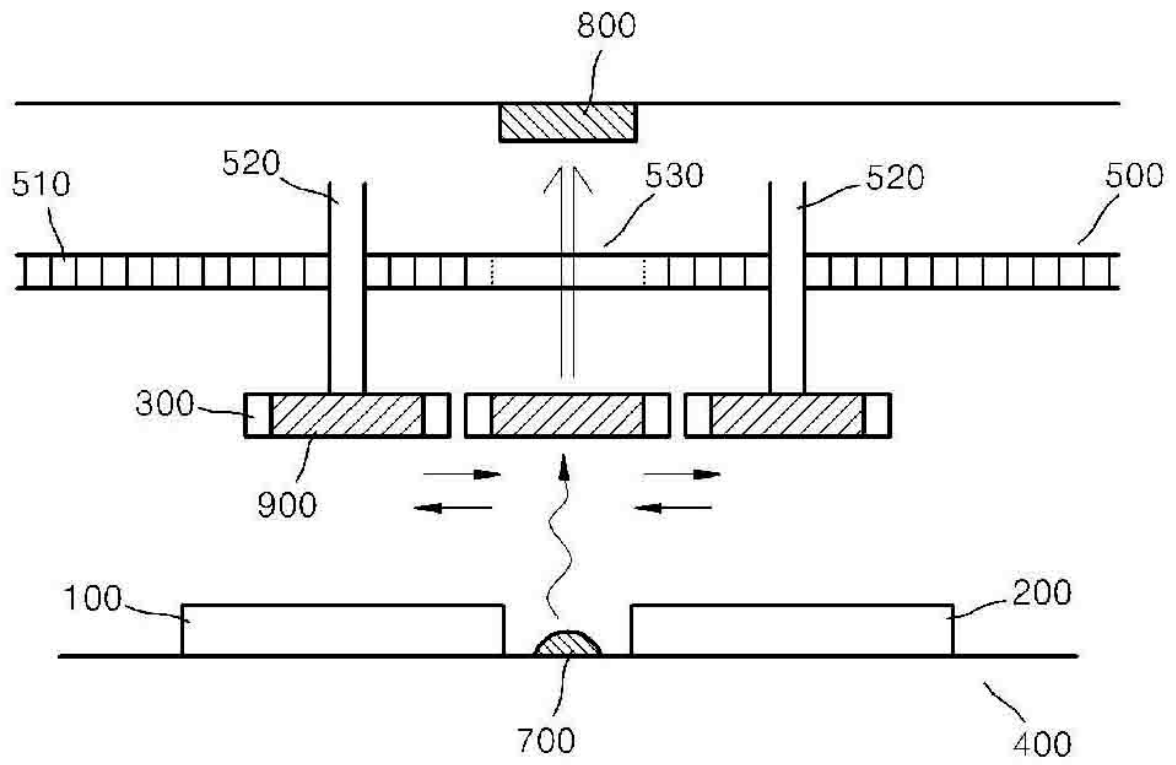


FIG. 4

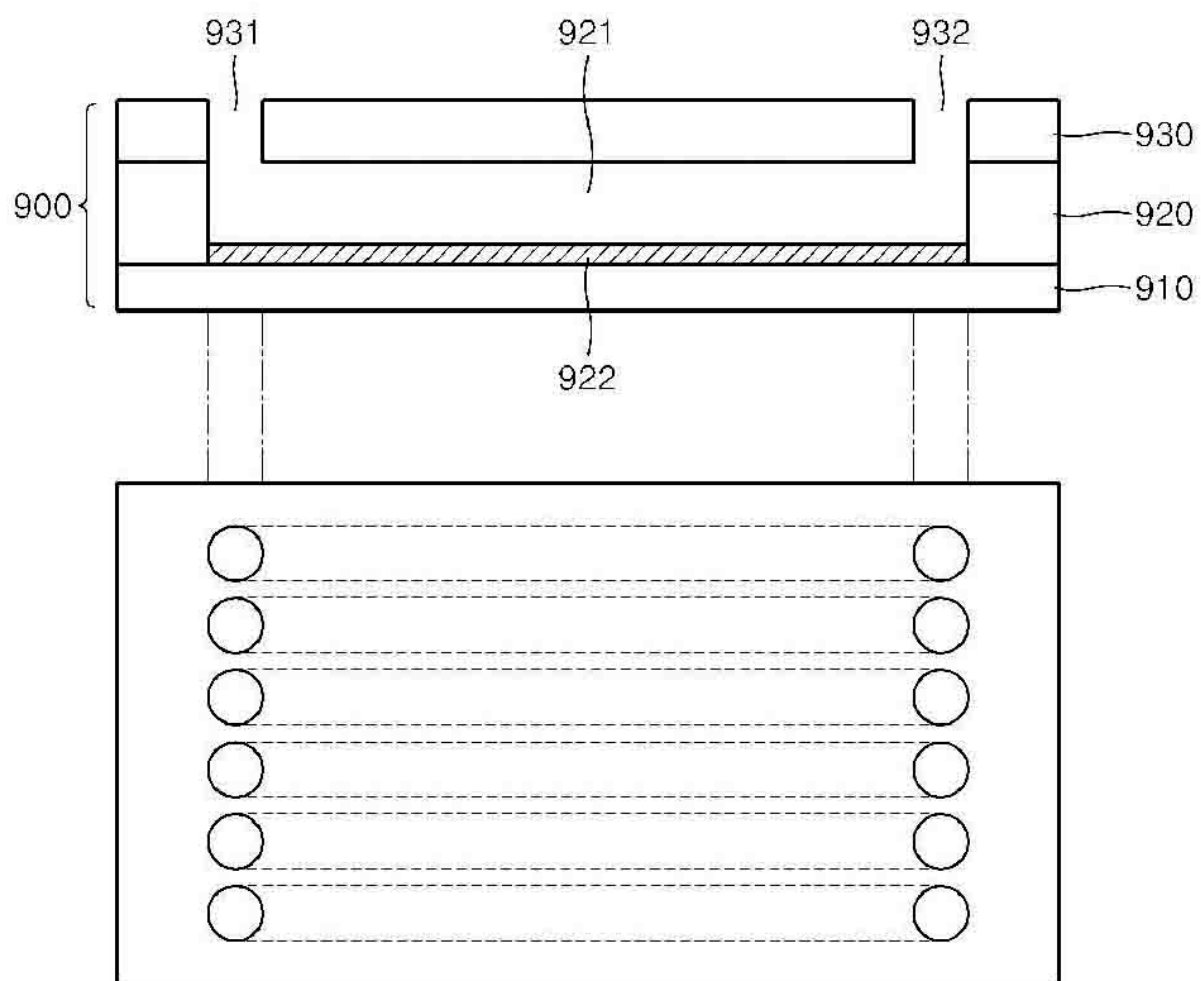


FIG. 5

