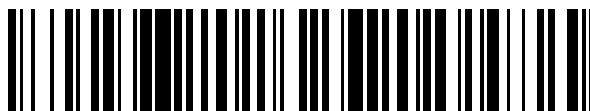


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 576 302**

51 Int. Cl.:

G01N 21/64 (2006.01)

G01J 3/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.12.2012** **E 12798696 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.03.2016** **EP 2791655**

54 Título: **Un dispositivo para medir ópticamente la fluorescencia de ácidos nucleicos en muestras de ensayo y uso del dispositivo**

30 Prioridad:

15.12.2011 EP 11193698

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.07.2016

73 Titular/es:

HAIN LIFESCIENCE GMBH (100.0%)
Hardwiesenstrasse 1
72147 Nehren, DE

72 Inventor/es:

COURTNEY, JAMES

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 576 302 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

Un dispositivo para medir ópticamente la fluorescencia de ácidos nucleicos en muestras de ensayo y uso del dispositivo

La presente invención se refiere a la medición de la fluorescencia de muestras de ensayo. Específicamente, la presente invención se dirige a un dispositivo para medir ópticamente la fluorescencia de muestras de ensayo de acuerdo con la reivindicación 1. Más específicamente, la invención se refiere a la medición de la fluorescencia de ácidos nucleicos en muestras de ensayo.

Estado de la técnica

La PCR (reacción en cadena de la polimerasa) convencional es muy conocida en la técnica, y se utiliza para amplificar una secuencia de ADN diana, sin embargo, también se puede utilizar para amplificar el ARN. Con la PCR convencional, la secuencia amplificada de ADN se detecta al final de la reacción en cadena usando geles de agarosa. Como alternativa, se pueden utilizar diferentes métodos basados en colorantes fluorescentes, donde la detección y/o cuantificación de la secuencia de ADN amplificada en una muestra de ensayo se puede realizar por medición óptica de la fluorescencia durante la reacción en tiempo real. En otras palabras, la secuencia de ADN amplificada en la muestra de ensayo se mide en cada ciclo de la PCR. Esta forma de la PCR se conoce como PCR cuantitativa PCR (QPCR) o PCR en tiempo real. Los ejemplos de colorantes fluorescentes que se usan en estos métodos son Sybr Green, EvaGreen o sondas de ADN que contienen fluoróforos de tipo FRET, tales como TaqMan. Estos colorantes se suelen intercalar o enlazar exclusivamente con el ADN bicatenario (ADNbc), es decir, el producto del ciclo de la PCR, que produce la fluorescencia del colorante. Durante la reacción, un aumento en el producto de ADN conduce, por tanto, a un aumento en la intensidad de la fluorescencia en cada ciclo. Este aumento se puede medir con un detector de fluorescencia, permitiendo de esta forma cuantificar las concentraciones de ADN por comparación con una dilución de muestra patrón. Los datos de la medición obtenidos se pueden representar gráficamente frente al número de ciclos en una escala logarítmica y se pueden analizar con un programa informático para determinar la cuantificación absoluta o relativa del ADN amplificado. La PCR en tiempo real también se puede aplicar a la detección y cuantificación de ADN en muestras para determinar la presencia y abundancia de una secuencia de ADN particular en dichas muestras.

Métodos similares basados en colorantes fluorescentes se pueden aplicar al análisis de la curva de fusión (MCA, por las siglas en inglés *Melting Curve Analysis*), que es una evaluación de las características de disociación del ADN bicatenario durante el calentamiento, es decir, una medición de la disociación del ADN amplificado frente a la temperatura.

Los dispositivos para realizar la PCR se conocen como termocicladores, y los dispositivos para llevar a cabo la medición óptica de la fluorescencia del ADN en muestras de ensayo durante la PCR cualitativa en tiempo real o en el análisis de la curva de fusión se denominan cicladores térmicos "de tipo óptico".

Estos cicladores térmicos "de tipo óptico" comprenden medios para calentar y enfriar alternativamente las muestras de ensayo durante los ciclos de PCR cualitativa/en tiempo real o para calentar las muestras de ensayo durante el análisis de la curva de fusión, respectivamente, junto con al menos una fuente de luz de excitación para excitar el colorante fluorescente de las muestras de ensayo, y al menos un detector de fluorescencia óptico para medir la fluorescencia emitida por el colorante tras la excitación. Los medios para calentar y enfriar las muestras de ensayo pueden comprender dispositivos Peltier para facilitar los cambios rápidos de temperatura de las muestras de ensayo. Como en el caso de los cicladores térmicos convencionales, se utilizan tapas calentadas para minimizar la evaporación de las muestras durante el proceso de ciclado térmico.

En los cicladores térmicos de tipo óptico actuales para su uso con los tubos de muestra de plástico convencionales, por ejemplo, los tubos de muestra para microcentrifuga de plástico convencionales utilizados normalmente para el análisis de ADN, tanto las fuentes de luz de excitación como los detectores de fluorescencia ópticos se disponen por encima de los pocillos para tubos de muestra en una tapa articulada del dispositivo. En estos cicladores, la excitación del colorante y la detección de la fluorescencia se llevan a cabo a través de la parte superior abierta de los tubos de muestra. Sin embargo, cuando se utiliza una tapa calentada, la tapa debe estar perforada o ser parcialmente transparente para permitir el paso de la luz de excitación y de la fluorescencia, lo que añade complejidad al dispositivo. Adicionalmente, esta configuración adolece de lo que se denomina variación en el alineamiento óptico, es decir, desviaciones en la posición de las fuentes de luz de excitación y los detectores de fluorescencia ópticos con respecto a los pocillos de muestra o tubos de muestra, que se pueden ocasionar, por ejemplo, por tolerancias de la tapa móvil.

Las variaciones en el alineamiento óptico son habituales en los termocicladores que tienen componentes móviles para colocar la fuente de luz de excitación o el sistema detector óptico o ambos por encima de los pocillos de muestra que contienen los tubos de muestra abiertos. Se divulga un ciclador térmico de ese tipo, por ejemplo, en el documento WO 2010/118541 A1, donde las unidades ópticas que comprenden una fuente de luz de excitación y un detector giran con respecto a las cámaras de muestra, conteniendo cada una de ellas una muestra. Las variaciones

en el alineamiento óptico también son habituales en los cicladores térmicos que tienen una bandeja móvil motorizada para desplazar los tubos de muestra dentro y fuera de una posición de tratamiento y medida.

Algunos de los cicladores térmicos de tipo óptico de la técnica anterior requieren la colocación de las muestras de ensayo en cámaras para muestras específicas personalizadas y no permiten la medición de las muestras de ensayo en los tubos de ensayo habituales, por ejemplo, los tubos de muestra convencionales de plástico para microcentrífuga utilizados en el análisis de ADN.

El documento US 6 515 743 81 divulga un dispositivo de tipo escáner de acuerdo con el preámbulo de la reivindicación 1 para la medición del producto de una reacción fluorescente producido mediante reacción enzimática. El dispositivo comprende una pluralidad de pocillos de muestra, para recibir un tubo de muestra vertical hecho de un material transparente y que contiene una muestra de ensayo. Los pocillos de muestra están dispuestos en un arco circular que tiene una unidad de transmisión para hacer girar el arco y desplazar sucesivamente los pocillos de muestra en las proximidades de una única fuente de luz de excitación. La fuente de luz de excitación dirige un haz de luz de excitación a través de la pared lateral de uno de los tubos de muestra. El dispositivo comprende además al menos un detector de fluorescencia óptico para capturar la fluorescencia emitida desde uno de los tubos de muestra a través del fondo del tubo de muestra. Una ruta óptica entre la parte inferior del tubo de muestra y el detector de fluorescencia comprende una guía de luz que tiene un extremo emisor situado en el centro del eje de rotación del arco circular.

El documento WO 2008/116186 A1 divulga un dispositivo para realizar un seguimiento de reacciones bioquímicas isotérmicas, por ejemplo, la amplificación de ácidos nucleicos o el crecimiento de células, tales como en una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando ciclado térmico. El dispositivo comprende un subsistema de excitación que incluye una primera y una segunda pluralidad de, por ejemplo, fuentes de excitación LED. Cada una de la primera/segunda pluralidad de fuentes de excitación está colocada para dirigir la energía electromagnética hacia al menos una porción del respectivo soporte de muestra 16, que está alojado en el respectivo receptáculo del receptor. El subsistema detector comprende detectores, cada uno de ellos colocado para detectar la energía electromagnética emitida por la muestra de un soporte de muestra que está alojado en el respectivo receptáculo del receptor. Los detectores están colocados en la cara inferior del receptor para recibir la fluorescencia ya que el receptor es un bloque de elevada masa térmica.

Descripción detallada de la invención

Un objetivo de la invención es proporcionar un dispositivo y un uso del dispositivo para medir ópticamente la fluorescencia de ácidos nucleicos en muestras de ensayo que pueden evitar las variaciones en el alineamiento óptico. Otro objetivo de la invención es proporcionar un dispositivo y un uso del dispositivo para medir ópticamente la fluorescencia de ácidos nucleicos en muestras de ensayo que permiten el uso de tubos de muestra convencionales, en particular tubos de microcentrífuga convencionales. Es un objetivo adicional de la invención proporcionar un dispositivo para medir ópticamente la fluorescencia de ácidos nucleicos en muestras de ensayo de tal forma que ni la excitación ni la detección de la fluorescencia se realice por encima de la muestra de ensayo, facilitando de esta forma el acceso a los pocillos de muestra, eliminando el requisito de perforaciones o ventanas transparentes en la tapa para permitir la transmisión óptica, y el potencial de utilizar otros medios que no sean una tapa calentada para evitar la evaporación de las muestras.

Para conseguir estos objetivos, la presente invención proporciona un dispositivo para medir ópticamente la fluorescencia de los ácidos nucleicos, preferentemente ADN, en muestras de ensayo de acuerdo con la reivindicación 1. Adicionalmente, también se divulga el uso del dispositivo para PCR cualitativa/tiempo real y/o para el análisis de la curva de fusión.

Con el dispositivo de acuerdo con la invención es posible localizar la fuente de luz de excitación, el pocillo de muestra y el detector de fluorescencia en una pieza unitaria del dispositivo de forma que se puede evitar cualquier posible movimiento relativo entre sí y, por tanto, cualquier variación en el alineamiento óptico. Por tanto, se puede garantizar completamente el alineamiento óptico.

Sorprendentemente, se posible utilizar tubos de muestra convencionales o personalizados con el dispositivo de acuerdo con la invención, en particular tubos de microcentrífuga convencionales, no suelen estar fabricados de polietileno transparente o translúcido. El polietileno transparente tiene una transmitancia de luz, o claridad, inferior al 90 %, principalmente aproximadamente un 80 % y, por tanto, no se considera un material de "calidad óptica" como se considera necesario para las mediciones ópticas de fluorescencia.

Además, el dispositivo de acuerdo con la invención puede facilitar el acceso a los tubos de muestra en los pocillos de muestra mediante una tapa, articulada o de otra forma, que debe estar en la forma de una placa metálica convencional ya que no se requieren perforaciones ni ventanas transparentes en la tapa. Ventajosamente, la tapa aplica una presión a los tapones de los tubos de muestra para mantener los tapones cerrados y los tubos de muestra en buen contacto térmico con las paredes de los pocillos de muestra durante el ciclado térmico. Preferentemente, la tapa puede estar provista de un calentador por resistencia, sencillo y asequible que se puede

utilizar para calentar el aire que está por encima de los tubos de muestra, minimizando de esta forma la condensación de la muestra en la parte superior o en el tapón del tubo. Cuando se prefiere dejar los tubos de muestra abiertos durante el ciclado térmico, se puede añadir un aceite o una cera en la parte superior de las muestras para evitar la evaporación. Puesto que no existe necesidad de transmisión de luz a través de la capa superior de aceite o grasa, esta puede ser opaca o temporalmente opaca, por ejemplo, cuando solidifica durante los ciclos de enfriado.

Cuando se compara con los termocicladores de piezas móviles, como el del documento WO 2010/118541 A1, no existe retraso en el tiempo de medida asociado con el desplazamiento mecánico de las piezas entre sí.

En el contexto de la presente invención, se entiende que el término "tubo de muestra" se refiere a un recipiente alargado generalmente tubular o vial utilizado para someter a ensayo muestras de ADN o de ARN. No es necesario que los tubos de muestra sean cilíndricos, sino que pueden ser algo cónicos en su longitud completa o a lo largo de una parte del mismo.

Como ya se ha mencionado anteriormente, sorprendentemente, la configuración óptica del dispositivo de acuerdo con la invención permite el uso de tubos de muestra convencionales, en particular tubos de microcentrífuga convencionales. Sin embargo, incluso cuando no se requiere fabricar los tubos de muestra a partir de un material de calidad óptica, puede ser ventajoso utilizar un material claro transparente con una transmitancia de luz de más de un 90 % en la fabricación de los tubos de muestra para mejorar la cantidad de luz fluorescente que incide sobre el detector fluorescente en un momento dado, es decir, el rendimiento del detector. Dado que los tubos de muestra son meros consumibles, están fabricados de material plástico. Preferentemente, se fabrican mediante moldeo por inyección a partir de un material termoplástico. Un material termoplástico preferido con una elevada transmitancia de claridad para la fabricación de tubos de muestra para el dispositivo de acuerdo con la invención puede ser el poli(tereftalato de etileno) (PET) debido a su excelente transmitancia de luz y su coste relativamente asequible.

De manera más preferida, pero no necesariamente, los tubos de muestra son tubos de microcentrífuga con una forma normalizada que es adecuada para el dispositivo de acuerdo con la presente invención. Sin embargo, para potenciar la transmitancia de la pared inferior en los extremos inferiores cerrados de los tubos de muestra que están frente a los detectores de fluorescencia, los tubos de muestra pueden estar provistos de un fondo plano en lugar del fondo redondeado convexo de los tubos de microcentrífuga convencionales. Los tubos de muestra tienen un volumen que es, preferentemente, inferior a 1 ml y puede ser de 0,2 o 0,5 ml.

De acuerdo con una realización adicionalmente preferida de la invención, la forma de la sección transversal de los pocillos de muestra para recibir los tubos de muestra verticales está adaptada a la forma de la sección transversal de los tubos de muestra. Debido a ello, es posible por una parte evitar variaciones en la medida de un ensayo a otro, o de muestra a muestra, porque los tubos de ensayo están firmemente sujetos en una posición definitiva con respecto a la fuente de excitación y el detector de fluorescencia, preferentemente en una posición donde los tubos de muestra están centrados en el interior de los pocillos de muestra de tal forma que cada eje de los tubos de muestra está alineado con los detectores de fluorescencia situados bajo sus extremos inferiores. El centrado de los tubos de muestra en el interior de los pocillos de muestra contribuye a un rendimiento máximo de los detectores de fluorescencia. Por otra parte, la transferencia térmica desde las paredes de los pocillos de muestra a los tubos de muestra se puede potenciar para poder calentar más rápidamente las muestras de ensayo en los tubos de muestra.

Ventajosamente, cada fuente de luz de excitación es un LED que emite luz de un espectro de longitud de onda específica incluyendo una longitud de onda adaptada para excitar un colorante fluorescente específico añadido al ADN en el tubo de muestra. Los LED adecuados están disponibles a un precio relativamente bajo, no comprenden ninguna pieza móvil y tienen una larga vida útil. Además, ocuparán solamente un espacio limitado en el termociclador.

Con uno o más LED por pocillo de muestra, cada tubo de muestra se puede calibrar fácil y sencillamente con respecto a la fluorescencia, es decir, cada pocillo se puede calibrar individualmente. Además, uno o más LED por pocillo de muestra garantizará continuamente una elevada intensidad de luz por pocillo y evitará las variaciones de iluminación de un pocillo a otro.

Preferentemente, cada detector de fluorescencia óptico comprende un único fotodiodo. Los fotodiodos medirán la fluorescencia emitida por el colorante con alta precisión, tiene un lapso de vida prolongado, con elevada fiabilidad y disponible a costes relativamente bajos. Sin embargo, en lugar de un fotodiodo, cada detector de fluorescencia también podría comprender un dispositivo de carga acoplada (CCD) para medir la cantidad de luz fluorescente que incide sobre una superficie de detección del detector. Con un fotodiodo específico por pocillo de muestra, el análisis será completamente consistente y no susceptible a la interferencia por diafonía.

Para evitar las variaciones en la medición de un pocillo a otro, las longitudes en los caminos ópticos de cada fuente de luz de excitación para el detector de fluorescencia asociado es el mismo para todos los pocillos de muestra, es decir, la longitud radial de un primer camino óptico desde cada fuente de luz de excitación hasta el eje del pocillo de muestra o tubo de muestra y la longitud axial de un segundo camino óptico desde la intersección del primer camino

óptico con el eje del pocillo de muestra o el tubo de muestra hasta la superficie del detector de fluorescencia son idénticos para todos los pocillos de muestra.

5 Para bloquear cualquier luz en el espectro de longitud de onda de la fuente de luz de excitación que no contribuya a la excitación del colorante o colorantes fluorescentes específicos añadidos a la muestra en el tubo de ensayo, de acuerdo con una realización preferida de la invención se considera disponer de un filtro de excitación óptica en el camino del haz de luz de excitación entre la fuente de luz de excitación y la pared lateral del tubo de muestra asociado, estando adaptado el filtro de excitación para transmitir solamente luz de la longitud o longitudes de onda específica adecuadas para el colorante o colorantes fluorescentes específico añadidos a la muestra. Adicionalmente, 10 preferentemente, un filtro óptico de emisión de luz se dispone entre el extremo inferior del tubo de muestras y el detector de fluorescencia óptico, estando adaptado el filtro de emisión para transmitir solamente la luz fluorescente emitida desde el colorante o colorantes. Ambos filtros ayudarán a evitar que cualquier luz parásita incida sobre el detector.

15 El dispositivo de la presente invención se puede utilizar ventajosamente tanto para el análisis de la curva de fusión como en la PCR cualitativa/en tiempo real.

Si el dispositivo de acuerdo con la divulgación se utiliza para el análisis de la curva de fusión, entonces, cada pocillo de muestra está preferentemente provisto de una fuente de luz de excitación única. Preferentemente, la fuente de 20 luz de excitación es un único LED dispuesto en un orificio radial en una pared de cada pocillo de muestra de tal forma que la boca del orificio esté frente a la pared lateral del tubo de muestra insertado en el pocillo de muestra para dirigir el haz de luz de excitación a lo largo del orificio y a través de la pared lateral del tubo de muestras hacia el interior de la muestra de ensayo para excitar el colorante fluorescente incluido en el mismo. El filtro de la luz de excitación, en su caso, está situado preferiblemente en la boca del orificio cerca de la pared lateral del tubo de 25 muestra.

En el dispositivo para realizar el análisis de la curva de fusión, cualquier fluorescencia emitida por el colorante fluorescente de la muestra se detecta mediante un único fotodiodo del detector de fluorescencia que está situado directamente debajo del tubo de muestra, convenientemente a una distancia suficiente para montar un filtro de 30 emisión óptica entre en extremo inferior del tubo de muestra y la superficie de detección del detector. Preferentemente, el filtro de emisión óptica es un filtro de paso de banda estrecho que está diseñado para transmitir las longitudes de onda concretas del espectro de emisión fluorescente del colorante en los tubos de muestra y para bloquear el resto de las longitudes de onda.

35 Por otra parte, si el dispositivo de acuerdo con la invención se utiliza en la PCR cualitativa/en tiempo real donde el tubo de muestra contiene la muestra de ensayo y una pluralidad de diferentes colorantes fluorescentes, es una ventaja utilizar correspondientemente una pluralidad de fuentes de luz de excitación que están dispuestas alrededor de cada pocillo muestra y que alternativamente se pueden encender, es decir, solamente una de cada vez. En este caso, el haz de luz de excitación procedente de cada pluralidad de fuentes de luz de excitación tiene una longitud de 40 onda o espectro de longitud de onda específico adaptado para excitar solamente uno de la pluralidad de los diferentes colorantes fluorescentes. Es preferible utilizar una pluralidad de diferentes LED coloreados que se correspondan con los diferentes colorantes de excitación. El haz de luz de excitación procedente de cada una de las fuentes de luz de excitación se puede hacer pasar a través de un filtro de excitación óptica que se corresponde o es específico de la fuente de luz de excitación particular con el fin de transmitir una única longitud de onda que 45 contribuya a la excitación de uno de los diferentes colorantes y para bloquear cualquier otra longitud de onda no deseada emitida, en su caso, por las fuentes de luz de excitación.

En el dispositivo para realizar la PCR cualitativa/en tiempo real, cualquier fluorescencia emitida por el colorante fluorescente de la muestra se detecta preferentemente mediante un único fotodiodo que está situado directamente 50 debajo del tubo de muestra. Adicionalmente, un filtro óptico de emisión óptica se dispone entre el extremo inferior del tubo de muestra y la superficie de detección del detector de fluorescencia. Para realizar la PCR cualitativa/en tiempo real multiplexada, permitiendo la detección y/o la cuantificación de múltiples genes diana de ADN en una única reacción multiplexada, el filtro de emisión es, preferentemente, en un filtro de paso de banda estrecho que está diseñado para transmitir solamente las longitudes de onda concretas del espectro de emisión de fluorescencia 55 asociado con todos los colorantes de los tubos de muestra, mientras que bloquea el resto de las longitudes de onda.

En este caso, los filtros de excitación de las fuentes de luz de excitación y la pared lateral del tubo de muestra asociado se pueden dispensar si las fuentes de luz de excitación son LED con un haz de luz de salida espectral de 60 banda estrecha y si un filtro de emisión de paso de banda estrecho múltiple se coloca entre el extremo inferior de cada tubo de muestra y el fotodiodo asociado.

El dispositivo de acuerdo con la invención comprende una pluralidad de pocillos de muestra para acelerar la medición de la fluorescencia de un número dado de muestras. Por ejemplo, el número de pocillos de muestras puede ser 2, 6, 10 o 12 o cualquier otro número adecuado. Para eliminar la diafonía entre pocillos vecinos, es 65 preferible activar las fuentes de luz de excitación de pocillos vecinos, de forma alternativa o cíclica, cambiando en primer lugar las fuentes de luz de excitación de los pocillos impares y, a continuación, las fuentes de luz de

excitación de los pocillos pares, una vez que las fuentes de luz de excitación de los pocillos impares se han vuelto a apagar, etc.

Para poder aumentar y disminuir rápidamente la temperatura de las muestras de ensayo en el interior de los tubos de muestra, los pocillos de muestra para recibir los tubos de muestra son preferentemente aberturas o cavidades de un bloque termoconductor que, a su vez, está en contacto íntimo con un dispositivo Peltier para calentar y enfriar a la vez la muestra de ensayo. Los tipos de materiales alternativos para el bloque térmicamente conductor incluye metales como aluminio y plata y plásticos o resinas termoconductoras, por ejemplo, CoolPoly D-Series, es decir, polímeros moldeables termoconductores que están disponibles de Cool Polymers, Inc., North Kingstown, RI, EE.UU., todos ellos seleccionados para potenciar la transferencia de calor.

En el dispositivo para realizar el análisis de la curva de fusión que solamente necesita una única fuente de luz de excitación para cada muestra, cuando el dispositivo Peltier tiene preferentemente una orientación vertical y está montado ventajosamente en el bloque termoconductor en el lado opuesto de la fuente de luz de excitación. En el dispositivo para realizar la PCR cualitativa/en tiempo real, el bloque termoconductor con las aberturas o cavidades para recibir los tubos de muestra, comprende preferentemente en su extremo inferior una extensión de placa unitaria en contacto íntimo con el dispositivo Peltier.

La presente invención se ilustra por referencia a las figuras ilustrativas, que abarcan diferentes vistas de dos realizaciones preferidas de la invención, en las que:

La Fig. 1 es una vista esquemática de una configuración de un termociclador de tipo óptico de acuerdo con la divulgación para realizar el análisis de la curva de fusión;

La Fig. 2 es una vista parcialmente en sección del termociclador que incorpora la configuración óptica de acuerdo con la Fig. 1;

La Fig. 3 es una vista en perspectiva de un conjunto de piezas que incorpora el termociclador de acuerdo con la Fig. 2;

La Fig. 4 es una vista en perspectiva parcialmente seccionada de otro conjunto de piezas incorporadas en el termociclador de acuerdo con la Fig. 2;

La Fig. 5 es una vista esquemática de la configuración óptica de otro tipo termociclador de tipo óptico de acuerdo con la invención para llevar a cabo la PCR cualitativa/en tiempo real;

La Fig. 6 es una vista parcialmente en sección del termociclador que incorpora la configuración óptica de acuerdo con la Fig. 5;

La Fig. 7 es una vista en sección tomada a lo largo de la línea VII-VII de la Fig. 6.

La configuración óptica 10 y el termociclador de tipo óptico 12 como se representa gráficamente en las Figuras 1 a 4 del dibujo son para su uso en el análisis de la curva de fusión, es decir, una medición de las características de disociación de las muestras de ensayo 14 del ADN bicatenario frente a la temperatura durante el calentamiento.

Cada muestra de ensayo 14 está incluida en un tubo de microcentrífuga 16 convencional, como se muestra mejor en las Figuras 1 y 2. Los tubos de microcentrífuga 16 son consumibles fabricados de polietileno transparente que tiene una transmitancia de luz inferior al 85 %, es decir, los tubos de microcentrífuga 16 no están fabricados de un material plástico de calidad óptica. La parte superior de cada tubo de microcentrífuga 16 está provisto de una tapa articulada 18 que se mantiene cerrada durante la medición para evitar la contaminación. Los tubos de microcentrífuga 16 tienen una pared lateral 20 que comprende una parte superior ligeramente cónica y una parte inferior cónica ligeramente más pronunciada para contener la muestra de ensayo 14 y tiene adicionalmente una pared del extremo redondeada o extremo 22.

A las muestras de ensayo de ADN 14 de los tubos de microcentrífuga 16 se añade un único colorante fluorescente, como Sybr Green, que se intercala, o se une, solamente al ADN bicatenario (ADNbc) de forma que una disminución en la cantidad de ADN bicatenario durante la disociación del ADN da como resultado la correspondiente disminución en la intensidad de la fluorescencia durante la excitación del colorante con una longitud de onda de excitación adecuada.

Para medir la intensidad de fluorescencia del colorante en una de las muestras de ensayo 14, el haz de luz de excitación procedente de un único LED 24 se dirige a través de un filtro de excitación óptica 26 y a través de la pared lateral 20 transparente del tubo de microcentrífuga 16 que contiene la muestra de ensayo 14. El LED 24 está adaptado para emitir un espectro de longitudes de onda que comprende una longitud de onda para excitar el colorante fluorescente añadido a la muestra de ensayo 14. El filtro de excitación 26 está adaptado para bloquear cualquier longitud de onda del espectro de longitudes de onda del LED 24 que no contribuya a la excitación del

colorante fluorescente. Para la detección de la fluorescencia del colorante, que resulta de la excitación y sale a través del extremo inferior 22 transparente del tubo de microcentrífuga 16, un único fotodiodo 28 se coloca debajo del extremo inferior 22 del tubo de microcentrífuga 16. Un único filtro de emisión 30 de paso de banda estrecho en el camino óptico entre el extremo inferior 22 del tubo de microcentrífuga 16 y el fotodiodo 28 está adaptado para transmitir solamente el espectro de emisión de fluorescencia asociado con el colorante, es decir, la fluorescencia resultante tras la excitación derivada del LED 24, y para bloquear cualquier otra longitud de onda.

Para llevar a cabo el análisis de la curva de fusión simultáneamente en una serie de muestras de ensayo 14, el termociclador 12 de las Figuras 2 a 4 comprende un número de pocillos de muestra 32 y el correspondiente número de LED 24 y fotodiodos 28, cada uno asociado a uno de los pocillos de muestra 32.

Como se puede observar mejor en las Figuras 2 y 3 los pocillos de muestra verticales 32 son orificios pasantes paralelos en un bloque termoconductor 34 rectangularmente alargado. Como puede observarse en la Fig. 2, cada uno de los orificios pasantes comprenderán una parte inferior cilíndrica y una parte superior verticalmente alargada. Las dimensiones de la parte superior están adaptadas a las dimensiones de los tubos de microcentrífuga 16 de forma que estos últimos encajen perfectamente en los pocillos de muestra 32 con su extremo superior proyectándose desde los pocillos de muestra 32. El bloque termoconductor 34 puede estar hecho de metal, como aluminio o plata, o de un material polimérico termoconductor y comprende el número correspondiente de perforaciones horizontales 36, que son perpendiculares a los orificios pasantes. Como puede observarse en la Fig. 2, cada perforación se extiende desde una cara lateral 38 del bloque termoconductor 34 en uno de los pocillos de muestra 32.

El bloque termoconductor 34 forma parte del conjunto térmico 40 representado gráficamente en la Fig. 3 que comprende además un dispositivo Peltier 42, un circuito impreso 44 y un pozo térmico de aluminio 46 con una pluralidad de aletas de refrigeración 50. Los dispositivos Peltier 42 se utilizan para calentar o enfriar rápidamente las muestras de ensayo 14 en los tubos de microcentrífuga 16 insertados en los pocillos de muestra 32, dependiendo del modo de funcionamiento del termociclador 12. Como puede verse mejor en la Fig. 2 los dispositivos Peltier 42 están montados en contacto estrecho con una cara lateral 48 del bloque termoconductor 34 que está en el lado opuesto de la cara lateral 38. El termociclador 12 comprende además un ventilador (no mostrado en los dibujos) para soplar aire a través de las aletas 50 del pozo térmico 46.

Los LED 24 y los fotodiodos 32 forma parte del conjunto óptico 52 representado gráficamente en la Fig. 4, que comprende además un bloque óptico 54 que aloja los LED 24 y los fotodiodos 32, el filtro de excitación 26, el filtro de emisión 30, y dos circuitos impresos 56, 58. El bloque óptico 54 tiene numerosos orificios 60 horizontales paralelos para cada uno de los LED 24. En un lado, el bloque óptico 54 está provisto de una repisa saliente 62 que tiene numerosos orificios 64 verticales paralelos. Cada orificio 64 aloja uno de los fotodiodos 28, con su superficie de detección orientada hacia arriba. Los orificios 60 y 64 tienen la misma separación, y están asociados entre sí. El lateral del bloque óptico 54 que está situado por encima de la repisa saliente 62 y la parte superior de la repisa saliente 62 está provista, cada una, con una cavidad rectangular alargada poco profunda para contener el filtro de excitación 26 y el filtro de emisión 30, respectivamente, que tienen cada uno la forma de un bloque rectangular alargado encajado en la correspondiente cavidad.

Tras montar los conjuntos 40 y 52 del termociclador 12 como se muestra en la Fig. 2, la repisa 62 se proyecta debajo del bloque de metal 34 de tal forma que la cara lateral 38 del bloque de metal 34 sobresale hacia el lado del bloque óptico 54 y la superficie inferior del bloque de metal 34 sobresale hacia el lado superior del estante 62 y los orificios verticales 64 de la repisa 62 están alineados con los orificios pasantes de los pocillos de muestra 32 y los orificios 36 del bloque termoconductor 34 están alineados con los orificios 60 del bloque óptico 54.

Además, el termociclador 12 está provisto de una tapa (que no se muestra en los dibujos) que se puede desplazar entre una posición abierta para introducir los tubos de microcentrífuga 16 dentro de los pocillos de muestra 32 y una posición cerrada para cubrir los extremos superiores de los tubos de microcentrífuga 16 que sobresalen de los pocillos de muestra 32. En la posición cerrada, la tapa aplica una presión a los tapones 18 de los tubos 16 para mantener los tapones 18 cerrados y los tubos 16 en buen contacto térmico con el bloque termoconductor 34 durante el ciclado térmico. La tapa está provista con un calentador por resistencia que calienta el aire que está por encima de los tubos 16 cerrados para minimizar la evaporación de la muestra y evitar que las muestras 14 se condensen en la parte superior de los tubos 16.

En numerosos ensayos que se realizaron con la configuración óptica 10 de acuerdo con la Fig. 1 en el termociclador 12 de acuerdo con las Figuras 2 a 5, se descubrió sorprendentemente que a pesar de la utilización de tubos de microcentrífuga 16 convencionales fabricados de polietileno transparente, se podía conseguir una correlación muy buena entre la temperatura de las muestras de ensayo 14 y la intensidad de fluorescencia medida con los fotodiodos 28, de forma que no era necesario fabricar los tubos de microcentrífuga 16 a partir de un material plástico de calidad óptica más caro que tenga una transmitancia de luz de más del 90 %.

La configuración óptica 70 y el termociclador de tipo óptico 72 como se representa gráficamente en las Figuras 5 a 7 del dibujo con para uso en la PCE cualitativa/en tiempo real, es decir, la detección y cuantificación simultáneas de

múltiples genes diana en una secuencia de ADN amplificada en las muestras de ensayo 14 por medición óptica de la fluorescencia en una única reacción multiplexada. Cada muestra de ensayo 14 está incluida, de nuevo, en un tubo de microcentrifuga 16 convencional, como se muestra mejor en la Fig. 5, junto con cuatro colorantes fluorescentes diferentes, que se intercalan o enlazan exclusivamente con el ADN bicatenario (ADNbc). Un aumento en la

secuencia de ADN amplificada durante la PCR ocasiona un aumento en la intensidad de la fluorescencia emitida por los colorantes tras su excitación con un espectro de longitudes de onda adecuado. Por medida de la intensidad de la fluorescencia, se pueden cuantificar las concentraciones de ADN por comparación con una dilución de muestra patrón.

Para llevar a cabo la PCR cualitativa/en tiempo real simultáneamente en varias muestras de ensayo 14, el termociclador 72 de acuerdo con las Figuras 6 y 7 también incluye un número de pocillos de muestra 32 con un fotodiodo 28 debajo del extremo inferior de cada pocillo de muestra 32. Sin embargo, a diferencia del termociclador óptico 12 que se ha descrito anteriormente, en el termociclador óptico 72, en lugar de un LED, se han instalado cuatro LED de diferentes colores 74, 76, 78, 80, asociados con cada pocillo de muestra 32 y un filtro de emisión de paso de banda estrecho 82 múltiple en lugar del filtro de monoemisión 64.

Para medir la fluorescencia de los cuatro colorantes de cada una de las muestras de ensayo 14, los haces de luz de excitación de los cuatro LED 74, 76, 78, 80 de cada pocillo de muestra 32 se dirigen simultáneamente a través de la pared lateral 20 transparente del tubo de microcentrifuga 16 que contiene la muestra de ensayo 14. Los cuatro LED están adaptados para emitir un espectro de longitudes de onda diferentes, comprendiendo cada una de ellas una longitud de onda para excitar uno de los colorantes fluorescentes añadidos a la muestra de ensayo 14. Cada uno de los LED 74, 76, 78, 80 puede estar provisto de su correspondiente filtro de excitación 94, como se muestra en la Fig. 5. Sin embargo, también se puede prescindir del filtro de excitación 94, como se muestra en la Fig. 7. La intensidad de la fluorescencia resultante de los colorantes fluorescentes que sale a través del extremo inferior 22 transparente del tubo de microcentrifuga 16 se detecta de nuevo mediante el único fotodiodo 28 debajo del pocillo de muestra 32 y el filtro de emisión de paso de banda estrecho 82 cuádruple. Este último filtro 82 en el camino óptico entre el extremo inferior 22 del tubo de microcentrifuga 16 y el fotodiodo 28 está adaptado para transmitir solamente el espectro de emisión de fluorescencia asociado con los cuatro colorantes y para bloquear cualquier otra longitud de onda.

Como puede observarse en la Fig. 7, los pocillos de muestra 32 verticales son cavidades que tienen el perfil de un tubo de microcentrifuga 16. Cada pocillo 32 está provisto de un único bloque termoconductor 86. Cada bloque 86 está insertado en el correspondiente agujero pasante conformado de un bloque óptico 84, teniendo el bloque óptico 84 una sección transversal generalmente hexagonal.

El bloque óptico 84 está provisto de cuatro orificios pasantes 88 horizontales alineados con los correspondientes orificios (no visibles) de bloque termoconductor 86 y se abren hacia los pocillos de muestra 32, cada uno de ellos para recibir uno de los LED 74, 76, 78, 80. Los orificios pasantes 88 y los LED 74, 76, 78, 80 están igualmente separados en la dirección perimetral del tubo de microcentrifuga 16 en el pocillo de muestra 32.

Para calentar y enfriar la muestra de ensayo 14 introducida en el tubo de microcentrifuga 16 en el pocillo de muestra 32, cada bloque termoconductor 86 presenta una extensión 90 horizontal de tipo placa que se extiende en paralelo a un dispositivo Peltier 42 montado bajo la extensión 90 de tipo placa. La superficie superior del dispositivo Peltier 42 está en contacto estrecho con la extensión 90 de tipo placa del bloque termoconductor 86. Un pozo térmico 46 hecho de aluminio con una pluralidad de aletas 50 está montado por debajo del dispositivo Peltier 42.

A diferencia del termociclador 12 de las Figuras 1 a 4, el termociclador 72 de acuerdo con las Figuras 5 a 7 no tiene una tapa calentada. En su lugar, se añade un aceite o una cera en la parte superior de las muestras 14 en los tubos de muestra 16 para evitar la evaporación. De esta forma, los tapones 18 de los tubos de muestra 16 se pueden dejar abiertos durante el ciclado térmico para evitar cualquier problema asociado con el cierre automático de los tapones 18.

Cuando se utiliza el termociclador 72, los LED 74, 76, 78, 80 de cada bloque óptico 84 se encienden de forma alternativa, es decir, uno de cada vez. Para eliminar la diafonía entre los pocillos de muestra 32 vecinos en el termociclador óptico 72, los LED 74, 76, 78, 80 de los pocillos de muestra 32 vecinos se encienden y apagan alternativa o ciclicamente. En otras palabras, los LED 74, 76, 78, 80 de todos los pocillos de muestra 32 de número impar de la fila de pocillos de muestra 32 que se ilustran parcialmente en la Fig. 7, se encienden sucesivamente mientras que los LED 74, 76, 78, 80 de todos los pocillos de muestra 32 de número par están apagados y, a continuación, los LED 74, 76, 78, 80 de todos los pocillos de muestra 32 con número par se encienden sucesivamente mientras que los LED 74, 76, 78, 80 de todos los pocillos de muestra 32 de número impar están apagados.

Cuando se lleva a cabo la PCR cualitativa/en tiempo real con sondas de ADN que contienen fluoróforos de tipo FRET, tales como TaqMan, en el termociclador 72 de las Figuras 5 a 7, es posible utilizar solamente uno de los LED 74, 76, 78, 80 junto con el filtro de emisión de paso de banda estrecho 82 cuádruple.

5 En numerosos ensayos que se realizaron con la configuración óptica 70 de acuerdo con la Fig. 5, en el termociclador 72 de acuerdo con las Figuras 6 y 7, también se descubrió que, a pesar de la utilización de tubos de microcentrífuga 16 convencionales fabricados de polietileno transparente, se podía conseguir una correlación muy buena entre la cantidad de los genes diana múltiples en las muestras de ensayo 14 y la intensidad de fluorescencia medida con los fotodiodos 28, de forma que no era necesario fabricar los tubos de microcentrífuga 16 a partir de un material plástico de calidad óptica más caro que tenga una transmitancia de luz de más del 90 %.

REIVINDICACIONES

1. Dispositivo para medir ópticamente la fluorescencia de muestras de ensayo (14) que comprende:

- 5 – una pluralidad de tubos de muestra (16) verticales fabricados de material transparente, que tienen una pared lateral (20), un extremo inferior (22) y que contienen una de las muestras de ensayo (14),
- una pluralidad de pocillos de muestra (32) verticales, cada uno de los cuales es para recibir uno de los tubos de muestra (16) verticales,
- 10 – al menos una fuente de luz de excitación (24; 74, 76, 78, 80) para dirigir un haz de luz de excitación a través de la pared lateral (20) de un tubo de muestra (16) al interior de la muestra de ensayo (14), y
- un detector de fluorescencia óptico (28) para capturar la fluorescencia emitida por la muestra de ensayo (14) al excitarla,

en el que

- 15 – las muestras de ensayo (14) contienen ácidos nucleicos y una pluralidad de colorantes fluorescentes,
- el dispositivo comprende una pluralidad de fuentes de luz de excitación (74, 76, 78, 80), dispuestas alrededor de cada pocillo de muestra (32), estando cada fuente de luz de excitación (74, 76, 78, 80) dispuesta cerca del pocillo de muestra (32) asociado para excitar un colorante en la muestra de ensayo (14) del pocillo de muestra (32);
- 20 – el haz de luz de excitación de cada una de la pluralidad de fuentes de luz de excitación (74, 76, 78, 80) tiene un espectro de longitudes de onda diferentes para excitar uno de la pluralidad de colorantes fluorescentes;
- el dispositivo comprende una pluralidad de detectores de fluorescencia ópticos (28),
- 25 – debajo del extremo inferior (22) de cada tubo de muestra (16) está situado uno de los detectores de fluorescencia (28) para capturar la fluorescencia emitida por el colorante de la muestra de ensayo (14) al excitarla ,
- el eje del tubo de muestra (16) alojado en el pocillo de muestra (32) está alineado con el detector de fluorescencia (28),

30 **caracterizado por que**

- cada pocillo de muestra (32) está provisto de un único bloque termoconductor (86),
- cada bloque termoconductor (86) está insertado en un orificio pasante de un bloque óptico (84),
- el bloque óptico (84) está provisto de orificios pasantes (88) horizontales,
- 35 – cada orificio pasante (88) aloja una de la pluralidad de fuentes de luz de excitación (74, 76, 78, 80) que están situadas alrededor de cada pocillo de muestra (32) y
- cada orificio pasante (88) está alineado con el correspondiente orificio del bloque termoconductor (86) que se abre hacia el pocillo de muestra (32).

40 2. Dispositivo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que los tubos de muestra son tubos de microcentrífuga (16) fabricados de un material plástico con una transmitancia de luz inferior al 90 %.

45 3. Dispositivo de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en el que las fuentes de luz de excitación son LED (24; 74, 76, 78, 80).

4. Dispositivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que cada detector de fluorescencia óptico comprende un único fotodiodo (28).

50 5. Dispositivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que un filtro de excitación (26; 94) está situado en un camino del haz de luz de excitación entre las fuentes de luz de excitación (24; 74, 76, 78, 80) y las paredes laterales (20) de los tubos de muestra (16), estando adaptado el filtro de excitación (26; 94) para transmitir solamente luz de una longitud de onda específica.

55 6. Dispositivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que un filtro de emisión de paso de banda estrecho (30; 82) está situado entre los extremos inferiores (22) de los tubos de muestra (16) y los detectores de fluorescencia ópticos (28), estando adaptado el filtro de emisión (30; 82) para transmitir solamente la luz fluorescente emitida por al menos un colorante.

60 7. Dispositivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende además una tapa, que se puede desplazar entre una posición abierta para introducir los tubos de muestra (16) en los pocillos de muestra (32) y una posición cerrada para cubrir la pluralidad de pocillos de muestra (32), y un calentador por resistencia en la tapa.

65 8. Dispositivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además una superposición en cada tubo de muestra (16) para cubrir la muestra de ensayo (14) en el tubo de muestra (16).

- 5 9. Dispositivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que un filtro de emisión de paso de banda estrecho (82) múltiple está situado entre los extremos inferiores (22) de los tubos de muestra (16) y los detectores de fluorescencia ópticos (28) y en donde el filtro de emisión (82) está adaptado para transmitir solamente la luz fluorescente emitida desde la pluralidad de colorantes fluorescentes.
10. Dispositivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además medios para activar alternativamente las fuentes de luz de excitación (24; 74, 76, 78, 80) de los pocillos de muestra (32) vecinos.
- 10 11. Dispositivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además al menos un dispositivo Peltier (42) para calentar y enfriar las muestras de ensayo (14) en los pocillos de muestra (32), estando el dispositivo Peltier (42) en contacto estrecho con un bloque termoconductor (34; 84) que rodea los pocillos de muestra.
- 15 12. Dispositivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la forma de la sección transversal de los pocillos de muestra (32) para recibir los tubos de muestra (16) verticales está adaptada a la forma de la sección transversal de los tubos de muestra (16).
- 20 13. Uso del dispositivo (12; 72) de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores para la PCR cualitativa/en tiempo real.

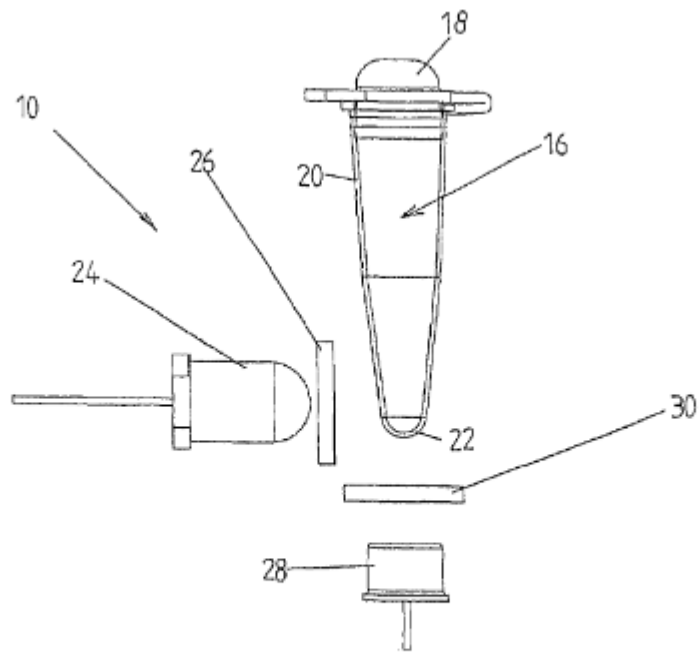


Fig. 1

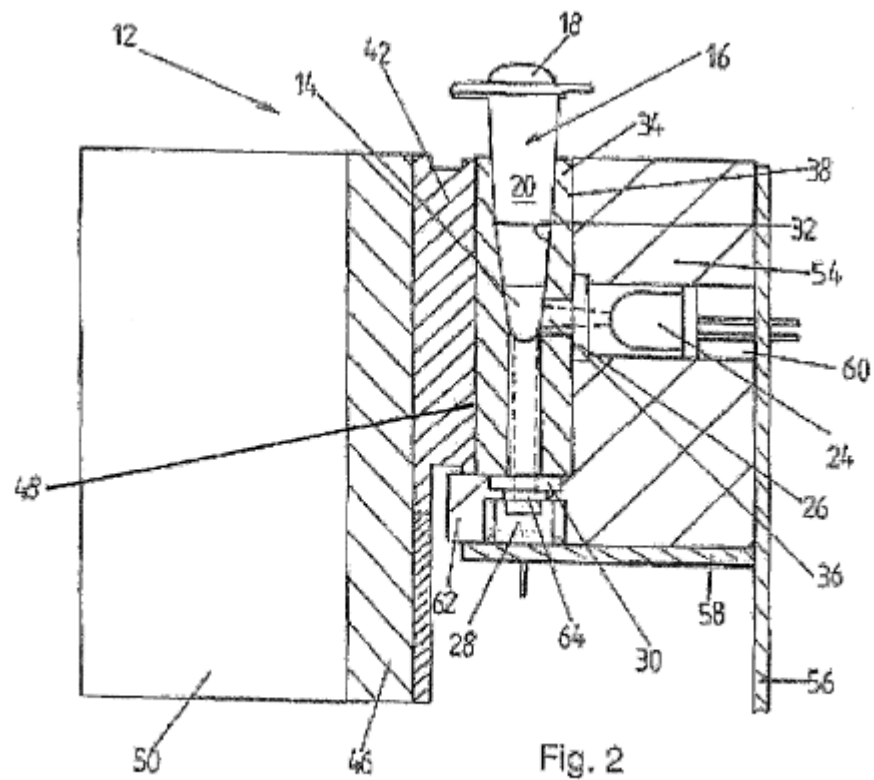
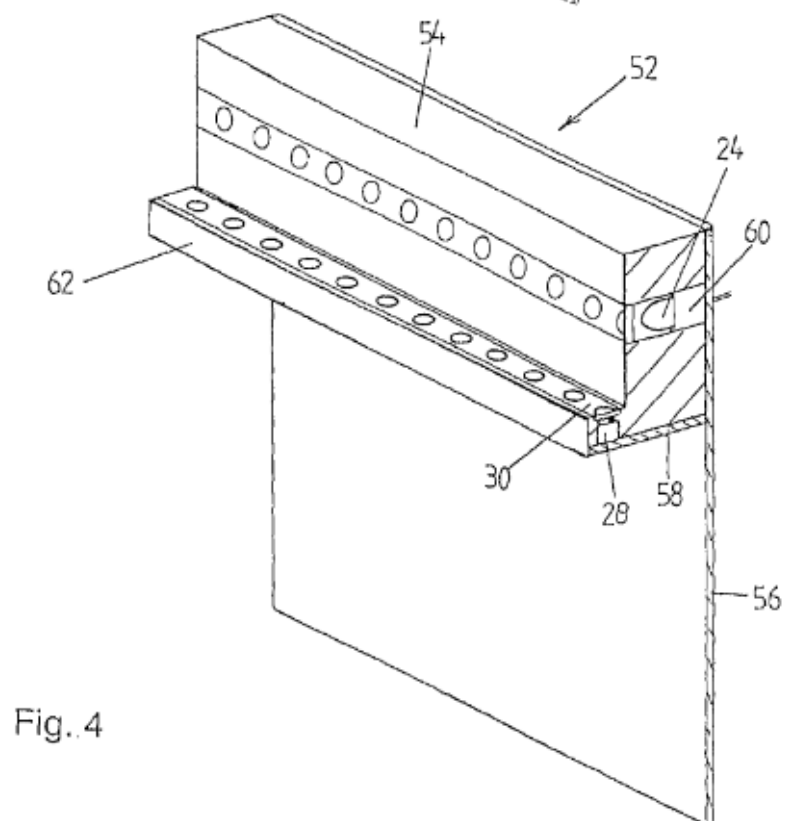
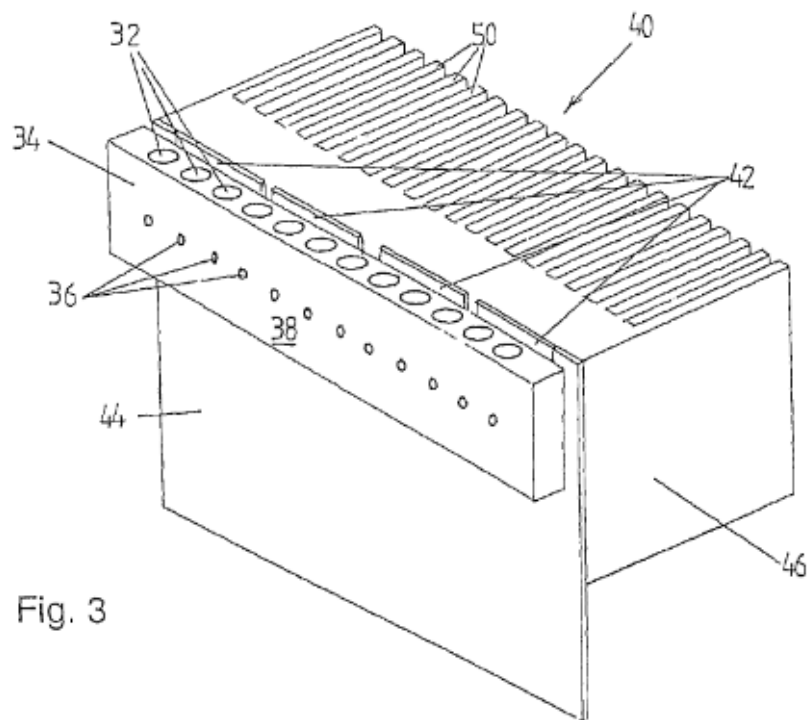


Fig. 2



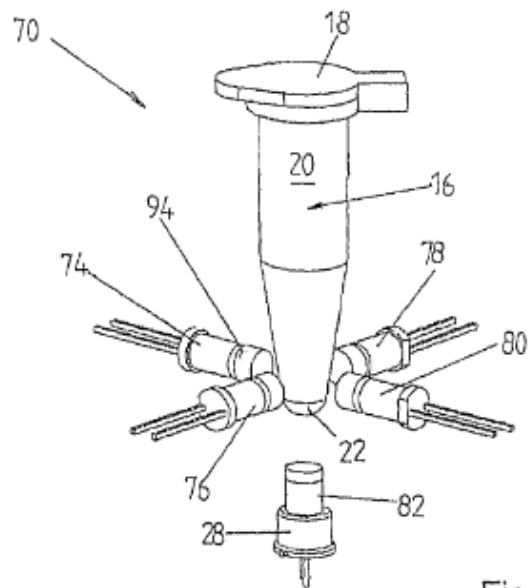


Fig. 5

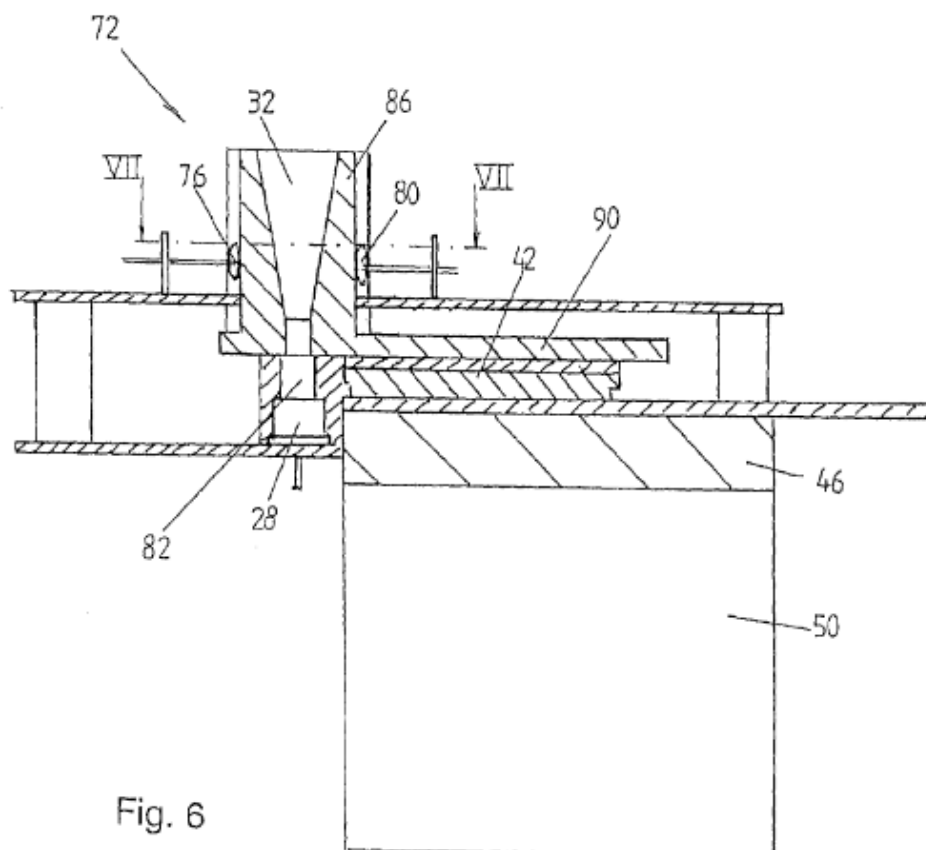


Fig. 6

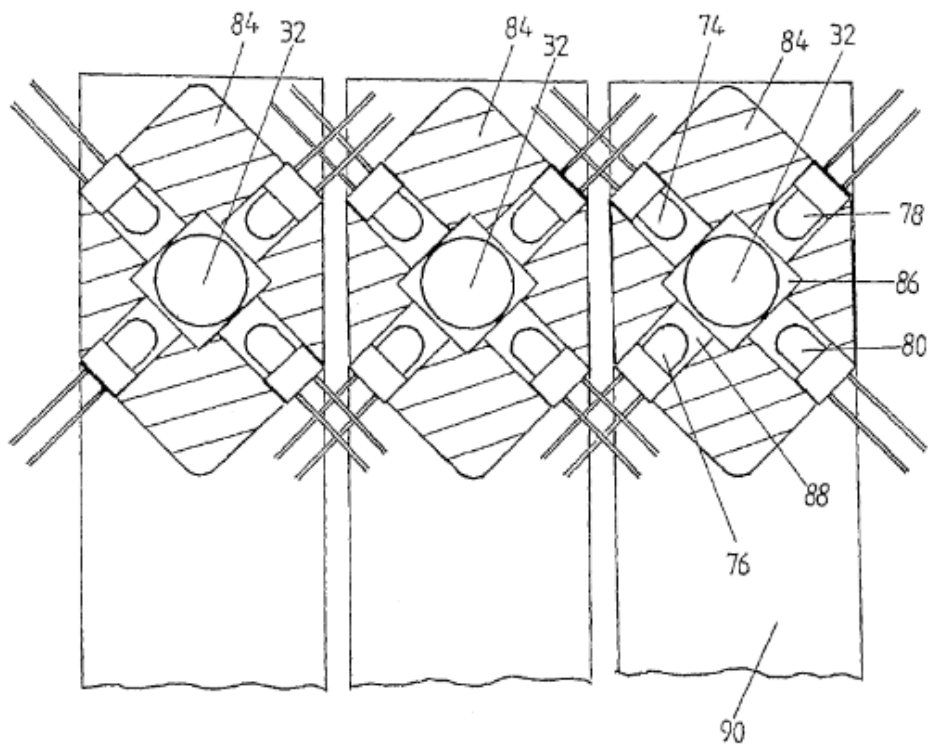


Fig. 7