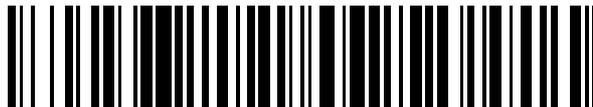


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 628 804**

51 Int. Cl.:

G01N 27/327 (2006.01)

B01L 7/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.04.2005 PCT/DE2005/000643**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.10.2005 WO05098438**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.04.2005 E 05740717 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.03.2017 EP 1743173**

54 Título: **Matriz de análisis con electrodos calefactables**

30 Prioridad:

06.04.2004 DE 102004017750

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

04.08.2017

73 Titular/es:

**FLECHSIG, GERD-UWE (100.0%)
MALCHINER STRASSE 3
17166 TETEROW, DE**

72 Inventor/es:

**FLECHSIG, GERD-UWE;
GRÜNDLER, PETER y
WANG, JOSEPH**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 628 804 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

Matriz de análisis con electrodos calefactables

La invención se refiere a una matriz de análisis con las características del preámbulo de la reivindicación 1.

5 Se conoce que en la analítica química y bioquímica a menudo deben determinarse varias especies analíticas (moléculas de acceso, moléculas analíticas) en una muestra. Así, por ejemplo, deben realizarse mediciones del pH y la determinación de diferentes iones con la ayuda de matrices, que están equipadas con diferentes electrodos sensibles a iones.

10 En la genética se plantea, por ejemplo, el problema de explicar una secuencia larga de ácido nucleico o re-localizar varias secuencias diferentes de ácido núcleo en una muestra. Esto se puede realizar con la ayuda de los llamados Chips-ADN, donde diferentes moléculas de ácido nucleico como moléculas especiales están inmovilizadas sobre elementos de rejilla propios, respectivamente, y sirven para el reconocimiento molecular de las moléculas de acceso. De esta manera, es posible determinar simultáneamente muchas secuencias parciales diferentes de un ácido nucleico natural.

15 En este caso, se recorren diferentes vías para la detección del evento de reconocimiento molecular. La mayoría de las veces se aplican procedimientos fluorométricos, pero también métodos electroquímicos individualizados.

Según el documento DE-OS 199 40 647 A1 se conoce que a través de la aplicación de una tensión alterna entre electrodo de trabajo y electrodo de referencia o bien contra electrodo se consigue que secuencias no complementarias se expulsen de oligo-sondas.

20 En cambio, se utiliza la conductividad eléctrica de cadenas dobles intactas de ADN según DE-OS 199 21 940 A1, puesto que en el caso de que existan parejas deficientes de bases, se reduce la conductividad.

También pertenece al estado de la técnica utilizar electrodos calefactables eléctricamente, que están modificados con moléculas de ácido nucleico. De esta manera es posible realizar o bien medir todas las etapas de la hibridación y detección a la temperatura propia respectiva, como se describe en DE-OS 199 60 398 A1.

25 Se conoce a partir de US 6.255.677 B1 un chip de análisis para el análisis de productos químicos y biológicos, sobre el que están dispuestos electrodos calefactables individualmente, que se pueden calentar localmente. Los electrodos con sus superficies de reacción poseen la forma de espirales cuadradas y se pueden calentar directamente. La sección transversal de la espiral se mantiene igual sobre toda la longitud.

30 La mayoría de las veces, el calentamiento de los electrodos se realiza indirectamente a través de una fuente láser con sistemas de lentes dispuestos especialmente o a través de hilos calefactores dispuestos adicionalmente en la proximidad de los electrodos.

35 En el documento EP 064 473 B1 se describe una disposición de electrodos para un agregómetro. Los electrodos presentan una forma de L invertida, de manera que los extremos inferiores de los electrodos están cubiertos en este lugar con un material aislante. Sin embargo, los cantos que se proyectan libremente hacia abajo se convierten en zonas activas eléctricamente, que se sumergen en el medio. El objetivo es aquí conseguir una zona conductora de electricidad para la medición exacta de trombocitos. Aquí no se ejerce ninguna influencia sobre la distribución de la temperatura dentro del electrodo.

40 Una disposición de calentamiento para un sensor semiconductor químico se describe en el documento EP 0 795 747 B1. El objetivo es calentar con la calefacción dispuesta alrededor de la zona de calefacción. Pero aquí también es un inconveniente que no se consigue una temperatura uniforme sobre la superficie del sensor semiconductor.

45 En los electrodos y matrices o bien chips de análisis calefactables conocidos, que están constituidos de electrodos calefactables eléctricamente, es un inconveniente que la temperatura de la superficie de los electrodos o bien la temperatura de las superficies de reacción de los electrodos sobre la matriz no es uniforme sobre toda la superficie de los electrodos. Se forman gradientes de temperatura no deseados sobre la superficie de los electrodos. La causa reside en la derivación de calor a través de alimentaciones de corriente térmica con área grande de la sección transversal. Estas áreas grandes de la sección transversal son necesarias por que de lo contrario no se calentarían los electrodos calefactable, sino las alimentaciones de corriente.

50 La consecuencia es una caída de la temperatura en los electrodos en la dirección de los dos puntos de contacto de corriente térmica. Condicionado por ello, con frecuencia durante la hibridación de ácido nucleico se producen involuntariamente detecciones positivas, aunque la sección de destino y la sección de sonda no son complementarias el ciento por cien entre sí.

55 La causa es que cadenas dobles defectuosas presentan todavía una cierta inestabilidad. La "temperatura de fusión"

T_m , es decir, la temperatura a la que se separan las dos cadenas de un ácido nucleico de cadena doble una de la otra, está reducida, sin embargo, aproximadamente 5K por pareja deficiente de bases, comparado con el ácido nucleico de cadena doble libre de fallos. Esto se puede aprovechar para el reconocimiento de parejas deficientes de bases, pero presupone un ajuste preciso de la temperatura sobre toda la superficie del electrodo. Cuanto más larga es la cadena doble, tanto más elevada es su temperatura de fusión. Si la sonda es suficientemente corta entonces T_m está sólo algunos grados sobre la temperatura ambiente. Se produce un desajuste, entonces la cadena doble defectuosa correspondiente es también inestable a temperatura ambiente.

El método de determinación descrito en DE-OS 199 40 647 A1 a través de la aplicación de una tensión / corriente eléctrica en el electrodo de trabajo tiene el inconveniente de que se pueden producir reacciones secundarias-Redox no deseadas con componentes de la matriz de la muestra o incluso del propio analito. Según la longitud y el contenido de guanidina/citosina de la frecuencia de la sonda, son necesarias corrientes muy diferentes durante la discriminación de parejas deficientes de bases.

El aprovechamiento de la conductividad de ADN de doble cadena, como se describe en el documento DE-OS 199 21 940 A1, presenta igualmente inconvenientes. Así, por ejemplo, el efecto discriminatorio entre cadena completamente complementaria (destino) y cadena deficiente en ciertas parejas de bases se reduce fuertemente o bien apenas existe (timina-timina, timina-citosina).

A través de la aplicación de matrices con electrodos de trabajo calefactable, por ejemplo de electrodos modificados con ácido nucleico, como se describe en DE-OS 199 60 398 A1 o US 6.255.677 B1, se introduce, en efecto, con la temperatura un parámetro variable posteriormente, que debe optimizar y acelerar las etapas de la hibridación así como debe posibilitar una regeneración de las moléculas de la sonda. Sin embargo, es un inconveniente que en un electrodo solamente se puede determinar, respectivamente, una especie analítica o bien la temperatura no es unitaria sobre toda la superficie de reacción del electrodo individual.

Además, son problemáticos factores perturbadores, que influyen en la temperatura predeterminada de los electrodos. Así, por ejemplo, debe compensarse una temperatura ambiente oscilante o una temperatura variable de la solución de muestra alimentada. Si no se compensan estos factores de interferencia, no es posible un ajuste exacto de las temperaturas necesarias de los electrodos.

También es un inconveniente que durante la medición y la calefacción eléctrica simultáneas, los electrodos calientes individuales de la matriz deben estar separados galvánicamente unos de los otros, porque de lo contrario no son posibles mediciones electroquímicas individuales.

Otro inconveniente cuando se trabaja con electrodos calientes es con frecuencia el calentamiento considerable de la solución de muestra. Especialmente en el caso de volúmenes muy pequeños de la muestra, como aparecen típicamente en análisis bioquímicos, ya una operación de corta duración de electrodos calientes puede conducir a un calentamiento de la solución de análisis de algunos Kelvin. Esto dificulta el ajuste de la temperatura deseada de los electrodos, reduce el efecto de microagitación útil y tiene como consecuencia una carga térmica no deseada de toda la solución de muestra.

Por lo tanto, un cometido de la invención es crear una matriz de análisis con electrodos calefactables selectivamente para la analítica química y bioquímica,

- a) cuyas superficies de electrodos individuales se pueden elevar a una temperatura propia respectiva, que tiene el mismo valor sobre toda la superficie de los electrodos, y
- b) en la que son posibles simultáneamente calentamiento eléctrico y mediciones electroquímicas, sin que se perturben los electrodos individuales entre sí y
- c) que no conduce a un calentamiento no deseado de la solución de muestra.

Este cometido se soluciona por las características distintivas de la reivindicación 1. Otras configuraciones ventajosas resultan a partir de las reivindicaciones dependientes.

De acuerdo con ello, según la invención, está previsto que los electrodos de la matriz estén constituidos con preferencia por una disposición de elementos en forma de capas conductoras de espesor opcional, especialmente de carbono, platino, paladio, oro, iridio, bismuto, cadmio, níquel, cinc, plata, cobre, hierro, plomo, aluminio, manganeso, mercurio o sus aleaciones, que se fabrican con ventaja a través de pulverización o evaporación sobre un material de soporte no conductor eléctrico, como por ejemplo vidrio y sustancias similares al vidrio, cerámica, diferentes tipos de polímeros, etc. como soportes planos.

Cada electrodo individual sobre el soporte posee en cada extremo un contacto de corriente eléctrica térmica para alimentaciones de corriente y se puede calentar eléctricamente.

Una ventaja especial es que estos contactos de corriente térmica con las alimentaciones de corriente se utilizan también para la conexión de instrumentos de medición electroquímicos así como eléctricos, por ejemplo potencióstatos, galvanostatos, amperímetros o voltímetros. Los contactos de corriente térmica y las alimentaciones de corriente eléctrica están recubiertos a ser posible con material adecuado, como vidrios, lacas o plásticos polímeros, para el aislamiento eléctrico, para impedir aquí el contacto con el electrolito (de la solución de muestra).

Según la invención, la disposición de los elementos conductores en forma de capas no está limitada a pulverización o evaporación, sino que se ha mostrado que los electrodos sobre el soporte se pueden fabricar también galvánicamente o a través de la disposición correspondiente de alambres metálicos, cintas metálicas finas, etc. Se pueden realizar electrodos de carbón calefactables especialmente en forma de capas impresas, como pastas de carbón en polvo o como carbón de vidrio en forma de capas y barras.

Según la invención, en los electrodos individuales se varía el área de la sección transversal al eje longitudinal del electrodo sobre su longitud, de manera que la sección transversal del electrodo es menor en la proximidad de los contactos de corriente térmica, que provocan una pérdida de calor grande.

En virtud de la sección transversal localmente más reducida en la proximidad de los contactos de corriente térmica, esta parte del electrodo se calienta más fuertemente durante la aplicación de la misma corriente térmica. Sin embargo, debido a la disipación mayor del calor sobre los contactos de corriente térmica con las alimentaciones de corriente eléctrica conectadas, se compensa precisamente este calentamiento más fuerte.

Según la invención, de esta manera es posible conseguir la misma temperatura sobre toda la superficie de los electrodos.

En este caso, se ha mostrado que es especialmente ventajoso que la superficie de los electrodos presente como superficie de reacción del electrodo una forma extendida alargada, pero aproximadamente ovalada, de manera que los contactos de corriente térmica con las alimentaciones de corriente eléctrica conectadas están dispuestos en los extremos estrechos de los electrodos. También es posible una reducción uniforme del área de la sección transversal en la dirección de los contactos de corriente térmica.

De esta manera, se ha mostrado que la relación de la sección transversal mínima del electrodo en los contactos de corriente térmica con respecto a la sección transversal máxima del electrodo puede ser de uno a uno y de uno a tres. Se ha revelado que es especialmente ventajosa una relación de uno a dos.

Pero de acuerdo con la invención la relación no está limitada ello, puesto que siempre depende de diferentes factores de influencia. Por una parte, depende de la magnitud de la disipación del calor sobre las alimentaciones de corriente en los contactos de corriente térmica, pero también de la magnitud de la diferencia entre la temperatura de los electrodos y la temperatura ambiente. De acuerdo con las condiciones de empleo se configura óptimamente la forma de los electrodos.

A través de la geometría según la invención del electrodo es posible obtener una temperatura uniforme en toda la superficie de los electrodos individuales de la matriz. Esta temperatura uniforme es especialmente necesaria, por ejemplo, para la determinación de la secuencia exacta en ácidos nucleicos que, en el caso de cadenas relativamente cortas de ácido nucleico, requiere un ajuste exacto de la temperatura de la superficie de los electrodos. Sólo de esta manera es posible la determinación exacta del material químico o bioquímico a investigar. Los errores en la determinación, por ejemplo, de secuencias de ácido nucleico se pueden excluir, por lo tanto, ya donde hasta ahora incluso inexactitudes pequeñas en el ajuste de la temperatura o de gradientes de temperatura sobre la superficie de los electrodos conducían con frecuencia a detecciones erróneas precisamente en secuencias relativamente cortas.

Pero según la invención también es posible cubrir la zona extrema de las superficies de los electrodos en los contactos de corriente térmica adicionalmente con una capa aislante térmica y eléctrica, para que se reduzca la pérdida de calor en la proximidad de los contactos de corriente térmica, de manera que no se produce ninguna pérdida de calor o sólo reducida en dirección axial. Esta cobertura puede estar limitada tanto al mero entorno del contacto de corriente térmica como también a una sección ampliada de la superficie de los electrodos. También es posible una combinación de ambos. En el caso de una cobertura parcial del electrodo en los extremos de los contactos de corriente térmica, es necesaria una modificación más reducida o incluso ninguna modificación del área de la sección transversal a lo largo del electrodo, pero de esta manera se limita un poco el tamaño de la superficie de reacción sobre el electrodo individual.

Pero también existe la posibilidad de dimensionar la longitud del electrodo extremadamente grande, de manera que las llamadas zonas extremas „frías“ en la proximidad de los puntos de contacto representan sólo una fracción muy pequeña con relación al electrodo total. En este caso extremo, se puede omitir la desviación de la temperatura en los extremos.

Según la invención también es posible disponer un tercer contacto en el electrodo. Este contacto, el llamado (tercer) contacto medio, debe mantenerse durante el contacto simétrico, con objeto de la conexión de un aparato de medición electroquímico, siempre tan pequeño que la pérdida de calor en este lugar sea, a ser posible, insignificamente reducida. Esto es posible sin más por que las corrientes electroquímicas a medir son aproximadamente 6 órdenes de magnitud inferiores que la corriente térmica.

Las alimentaciones de corriente a los electodos individuales de la matriz se pueden realizar de diferentes maneras. En una forma de realización, las alimentaciones de corriente se conducen después del electrodo desde abajo a través del soporte. Pero también existe la posibilidad de conducir las alimentaciones de corriente en el mismo plano que el electodo en el borde de la matriz. Ambas variantes, también en la forma acoplada, son posibles y no deben limitar la invención.

Se mide la caída de la tensión de la corriente calefactora sobre cada electrodo individual con la forma según la invención de la superficie del electrodo. Junto con el valor de la corriente térmica, que fluye a través de este electrodo, se calcula la resistencia según la fórmula $R = U/I$. A través de la relación $R = R_0(1+\alpha T)$ (con el valor de referencia de la resistencia R_0 y el coeficiente de temperatura α de la resistencia eléctrica), la resistencia medida es una medida de la temperatura del electrodo.

La resistencia calculada de esta manera se regula en lugar de la temperatura del electrodo para cada electrodo individualmente a través de adaptación de la corriente térmica respectiva (método multi-canal). De esta manera, se compensan influencias de interferencia térmica, que pueden actuar sobre cada electrodo también individualmente de manera algo diferente. Con preferencia, se conecta el recorrido de medición con el recorrido de regulación para la prevención de interferencias a través de un optoacoplador.

El suministro de corriente común se puede realizar, por ejemplo, a través de un transformador como fuente de corriente. El flujo de corriente a los electodos individuales se interrumpe a través de conmutadores dobles múltiples conectados delante y detrás en el instante de la medición electroquímica. La tensión que se aplica en los electodos y la intensidad de la corriente se miden por separado en cada electrodo y los valores calculados se transmiten al regulador respectivo. Cada regulador está conectado de nuevo con el miembro de ajuste respectivo (por ejemplo, una resistencia electrónica), que influye sobre la cantidad de corriente, que debe alimentarse al electrodo. De esta manera es posible regular exactamente la temperatura de cada electrodo individual.

Pero de acuerdo con la invención también es posible controlar globalmente la temperatura de los electodos individuales, ajustando la corriente para la matriz general por medio de un miembro de ajuste (por ejemplo, de una resistencia electrónica). Esto es menos costoso, porque se trata de un sistema monocanal. En este caso, no hay que tener en consideración oscilaciones individuales de la temperatura. La señal de medición se obtiene en este caso a través de un sensor central de temperatura, que está conectado con la unidad de control.

En esta disposición sencilla se realiza una previsión de las temperaturas individuales de los electodos individuales por que además del ajuste básico y del control de la matriz general a través de un miembro de ajuste central, delante de cada electrodo individual está dispuesta una resistencia de ajuste.

También en este caso se alimenta la matriz con corriente, por ejemplo a través de un transformador. A través de al menos un sensor de temperatura, que está dispuesto sobre la matriz entre los electodos, se calcula la temperatura y se conduce el valor de la temperatura a la unidad de control, que influye sobre al menos un miembro de ajuste (por ejemplo, una resistencia electrónica) para el sistema térmico general. De esta manera se consigue que se ajuste y se controle de forma central una intensidad determinada de la corriente, que es necesaria para el calentamiento de los electodos.

A través de conmutadores dobles múltiple, según la posición de los conmutadores, se suministra o no corriente a los electodos individuales. De esta manera es posible atemperar de manera diferente los electodos sobre la matriz, controlar globalmente las temperaturas ajustadas y realizar de manera separada en el tiempo una pluralidad de mediciones electroquímicas, sin que se perturben durante estas últimas los electodos individuales.

Si se realizan el calentamiento eléctrico y la medición electroquímica sucesivamente, se puede desacoplar galvánicamente, como se ha descrito arriba, por medio de conmutadores dobles múltiples, la matriz de electodos del sistema térmico. Este medida se prohíbe cuando debe medirse y calentarse al mismo tiempo.

En su lugar debe realizarse aquí una separación galvánica separando cada electrodo con un transmisor propio del sistema térmico. Esto se puede realizar fácilmente durante el control global de la temperatura. Durante la regulación individual de la temperatura, es necesaria adicionalmente una separación galvánica también en los circuitos de regulación entre los aparatos de medición para resistencia eléctrica del electrodo y el miembro de ajuste respectivo (por ejemplo, resistencia electrónica) en el sistema térmico. Esto se puede realizar, por ejemplo, con optoacopladores.

5 Un elemento de refrigeración con un lado inferior plano, que está constituido con preferencia de aluminio o cobre, se dispone sobre la matriz, de manera que la solución de muestra se incluye en una capa fina entre matriz y elemento de refrigeración. El elemento de refrigeración puede estar conectado, por ejemplo, con un cuerpo de refrigeración nervado pasivo suficientemente dimensionado. En el caso de cantidades mayores de calor o temperaturas iniciales por debajo de la temperatura ambiente, se puede conectar también un elemento-Peltier con el elemento de refrigeración o puede ser idéntico a éste. La superficie plana del elemento de refrigeración, que está en contacto con la solución de muestra, está revestida ventajosamente con una capa inerte de oro o de platino. El elemento de refrigeración se puede emplear en virtud de la superficie grande con ventaja también como contra electrodo común.

10 Otras ventajas, detalles y características esenciales de la invención se deducen como ejemplo a partir de las explicaciones detalladas siguientes de la invención con la ayuda de los dibujos adjuntos.

15 La figura 1a muestra una matriz con 16 electrodos en la vista en planta superior.

La figura 1b muestra una matriz con electrodos en la sección transversal.

La figura 2 muestra una matriz con electrodos en disposición superficial.

20 La figura 3 muestra una matriz con electrodos en forma de U, estando conectados dos electrodos para formar una disposición simétrica.

La figura 4 muestra una matriz con 16 electrodos en la vista en planta superior con sensor de temperatura.

25 La figura 5 muestra un diagrama de bloques de principio de la regulación de la temperatura individual.

La figura 6 muestra la conexión de la matriz para regulación individual de la temperatura y acoplamiento sobre conmutador doble múltiple.

30 La figura 7 muestra la conexión de la matriz para regulación individual de la temperatura y acoplamiento de los electrodos sobre transmisores propios, respectivamente.

La figura 8 muestra un diagrama de bloques de principio del control de temperatura global.

35 La figura 9 muestra la conexión de la matriz con el control central de temperatura y acoplamiento sobre conmutadores dobles múltiples.

La figura 10 muestra la conexión de la matriz con control central de la temperatura y acoplamiento de los electrodos sobre transmisores propios, respectivamente.

40 La figura 11 muestra la refrigeración de la solución de muestra sobre la matriz con un cuerpo de refrigeración nervado pasivo.

45 La figura 12 muestra la refrigeración activa de la solución de muestra sobre la matriz con un elemento-Peltier y un cuerpo de refrigeración nervado.

A continuación se proveen las mismas partes con los mismos signos de referencia.

50 En las figuras 1a y 1b se representa una matriz con dieciséis electrodos 13 de oro, que están aplicados a través de pulverización sobre un soporte 3 de vidrio. Cada electrodo está modificado con un SAM de ácido nucleico individual, que está constituido por cadenas de sondas modificadas-HS, el medio de reacción 6, que sirve para el reconocimiento de una cadena de acceso en la solución de muestra 22. El borde de las superficies de los electrodos 7 está en este caso ligeramente curvado, de manera que la forma de la superficie de los electrodos 1 presenta una geometría ovalada extendida alargada. La relación entre la anchura máxima de la superficie de los electrodos 1 y la anchura mínima directamente en la capa de cubierta 4 de los contactos de corriente térmica 5 es de 10 : 7. Los contactos de corriente térmica 5, 5' en los extremos del electrodo 13 están conectados con las alimentaciones de corriente 2, 2' para el calentamiento del electrodo 13 que, como se muestra en la figura 1b, se conducen desde abajo a través del soporte 3. Los extremos del electrodo 13 están cubiertos adicionalmente por medio de una capa de cubierta 4, 4' de plástico. De esta manera, existe un aislamiento eléctrico contra la solución adyacente y dado el caso, cuando la cobertura de la superficie de los electrodos 1 es mayor, existe también una reducción de la pérdida de calor.

60 Está claro que la anchura de la superficie de los electrodos 1 se reduce a lo largo del eje longitudinal 8 hacia los contactos de corriente térmica 5, 5', en este caso en la relación de 10 : 7.

En la figura 2 se representa una disposición de matriz en forma plana. El electrodo 13 contacta en los extremos con las alimentaciones de corriente 2, 2', que están dispuestas en este caso exactamente como el electrodo 13 en la horizontal sobre el soporte 3. Las alimentaciones de corriente 2, 2' están revestidas con un material aislante de plástico como capa de cubierta 4, 4'.

La matriz según la invención se forma alternativamente por un paquete, como se representa en la figura 3, de chapas metálicas verticales como alimentaciones de corriente 2, 2'. Las chapas metálicas están alineadas paralelas y están separadas por capas aislantes. Los cantos libres superiores dispuestos paralelos de las chapas metálicas (alimentaciones de corriente 2, 2') sirven como contactos de corriente térmica 5, 5' para los electrodos calefactables finos 13, 13'. Esta disposición garantiza que a pesar de las dimensiones reducidas, el área de la sección transversal de las alimentaciones de corriente 2, 2' es mucho mayor que el área de la sección transversal de los electrodos calefactables 13, 13'. La uniformidad de la distribución de la temperatura sobre la superficie 1 de los electrodos 13 y dentro de los electrodos 13 individuales se garantiza por que una parte no reducida de la superficie de los electrodos 1, a calcular empíricamente en cada caso, está cubierta en la proximidad de la alimentación de corriente 2 por la caba de cubierta 4 aislante eléctrica. Los electrodos calefactables 13, 13' están constituidos por dos partes en forma de U, que están unidas entre sí y forman una disposición simétrica. En los puntos de unión están previstos los contactos medios 19, 19' para la conexión de instrumentos electroquímicos.

En la figura 4 se representa una matriz, similar a la figura 1. Sin embargo, en esta disposición se mide la temperatura entre los electrodos 13, 13' por un sensor de temperatura 9, que influye en una unidad de control no representada.

La figura 5 muestra el diagrama de bloques de principio de una regulación de la temperatura de los electrodos de la matriz, donde dos circuitos de regulación parciales de la matriz se representan como fragmento. La corriente térmica alimentada a los electrodos 13, 13' se ajusta por miembros de ajuste (por ejemplo, resistencias electrónicas 12, 12'). El control de los miembros de ajuste se realiza sobre los reguladores 17, 17', que adquieren los datos de medición necesarios desde los miembros de medición para corriente (amperímetros 16, 16') y tensión (voltímetros 15, 15').

La figura 6 muestra el diagrama de flujo para la regulación individual de la intensidad de la corriente de una matriz de acuerdo con la invención, en la que se realizan la calefacción y la medición electroquímica sucesivamente. La alimentación de corriente se realiza a través del transformador central 14 representado. Unos conmutadores dobles múltiples 11, 11' delante y detrás de los electrodos 13, 13', 13'' conmutan el flujo de corriente a través de los electrodos 13,13',13'' para el calentamiento de éstos y permiten una separación galvánica de los electrodos 13,13',13'' entre sí con la finalidad de mediciones electroquímicas. Al mismo tiempo se miden a través de voltímetros 15,15',15'' las tensiones que se aplican en los electrodos 13,13',13'' y las intensidades de la corriente por medio de los amperímetros 16,16',16''. Los datos obtenidos se emiten a los reguladores 17, 17', 17'' asociados a los electrodos 13,13',13'', que influyen sobre las resistencias electrónicas 12, 12',12'' para el flujo de corriente.

La figura 7 muestra el diagrama de conexiones para una regulación de la temperatura individual, en la que se realizan simultáneamente la calefacción y la medición electroquímica. En este caso, los electrodos calientes 13, 13' están separados galvánicamente entre sí en cada instante. El acoplamiento a la alimentación de corriente térmica se realiza con la ayuda de transmisores 18, 18' individuales. Para la conexión simétrica del aparato de medición electroquímico en los electrodos calientes 13, 13' sirven los contactos medios 19, 19'.

La figura 8 muestra la estructura de principio de un control central de temperatura de todos los electrodos con un miembro de ajuste central (por ejemplo, resistencia electrónica 12), que influye en la corriente calefactora para todos los electrodos 13, 13',13''. A través de la unidad de control 10 se controla cuáles de sus datos son tomados por el miembro de medición (sensor de temperatura 9). Se consigue un calentamiento diferente a través de resistencias de ajuste 20, 20', 20'' anteconectadas.

En la figura 9 se representa una variante sencilla, en la que no están previstas calefacción y mediciones electroquímicas simultáneas. El suministro de corriente se realiza también aquí a través de un transformador central 14, siendo controlada la corriente, que debe fluir a través de los electrodos 13, 13', 13'', de forma centralizada sobre la resistencia electrónica 12. Esta resistencia 12 se controla a través de la unidad de control 10, es influenciada por el sensor de temperatura 9, que está dispuesto sobre la matriz, como se deduce a partir de la figura 4. Delante y detrás de los electrodos 13, 13', 13'' están dispuestos de nuevo conmutadores dobles múltiples 11, 11', que permiten una separación galvánica de los electrodos entre sí para fines de mediciones electroquímicas. A través de las resistencias de ajuste 20, 20', 20'', que están asociadas directamente a los electrodos 13, 13', 13'', se puede ajustar la diferencia de la intensidad de la corriente para el calentamiento entre los electrodos 13, 13', 13'' individuales, para que se realice un calentamiento diferente de los electrodos 13, 13', 13''.

La figura 10 ilustra una variante sencilla, para separar los electrodos 13, 13' de manera galvánica permanente entre sí, con la ayuda de transmisores 18, 18' individuales, de manera que son posibles al mismo tiempo la calefacción y

mediciones electroquímicas. Para la conexión simétrica de un aparato de medición electroquímico en los electrodos calientes sirven también aquí los contactos medios 19, 19'.

5 En la figura 11 se representa cómo se mantiene constante la temperatura de la solución de muestra 22 con la ayuda de un cuerpo de refrigeración pasivo 21. La solución de muestra 22 se encuentra en forma de una capa fina entre la matriz de electrodos (que está constituida por los electrodos 13 sobre el soporte 3) y el cuerpo de refrigeración 21.

10 La figura 12 muestra una variante con refrigeración activa de la solución de muestra 22. Entre el cuerpo de refrigeración 21 y la solución de muestra 22, que se encuentra sobre el electrodo 13 y el soporte 3, está dispuesto un elemento-Peltier 23. En la superficie caliente 24 del elemento-Peltier 23 se apoya un cuerpo de refrigeración 21. De esta manera, se puede refrigerar, por una parte, la solución de muestra 22 en la superficie fría refrigerada 25 del elemento-Peltier 23 a valores por debajo de la temperatura ambiente y, por otra parte, se puede ajustar la temperatura de la solución de muestra 22 a través de la influencia de la corriente Peltier a un valor opcional. Con ventaja, el lado inferior del cuerpo de refrigeración 21 o del elemento Peltier 23, que está en conexión con la solución de muestra 22, está recubierto con oro o platino. Esta capa de oro o platino sirve como contra electrodo común para los electrodos de trabajo de la matriz para fines de medición electroquímica.

Ejemplo 1

20 La matriz está constituida por una disposición de elementos de metales nobles en forma de capa, electrodos 13, que ha sido producida a través de pulverización o evaporación sobre el soporte 3 de vidrio. La forma ovalada según la invención de los electrodos 13 se representa en las figuras 1, 2 y 4. A través de esta forma se consigue según la invención un calentamiento superficial uniforme de los electrodos 13 individuales, tan pronto como se conecta la corriente térmica. Cada electrodo 13 posee dos contactos de corriente eléctrica térmica 5, 5', en los que están conectadas alimentaciones de corriente 2, 2' de cobre con área de la sección transversal grande y se puede calentar eléctricamente. Los contactos de corriente térmica 5, 5' sirven igualmente para la conexión de instrumentos de medición electroquímicos, por ejemplo potencióstatos, galvanostatos, voltímetros. En la figura 1b se representan capas de cubierta 4, 4', que aíslan eléctricamente los contactos de corriente térmica 5, 5' y las alimentaciones de corriente eléctrica 2, 2'.

Ejemplo 2

30 La matriz según la invención está constituida por una disposición de alambres de oro finos con un diámetro de 25 μm . Cada pieza de alambre representa un elemento calefactable de la matriz de análisis. Está modificado en su superficie con una monocapa auto ensamblada de oligómeros de ácido nucleico. Todas las piezas de alambre se pueden controlar por separado y, por lo tanto, pueden ser recorridas por corrientes térmicas ajustadas individuales, respectivamente. La hibridación y su detección se extienden como se indica en el ejemplo 3. Una temperatura uniforme a lo largo del alambre se consigue a través de una cubierta parcial con material aislante en la zona de los contactos de corriente térmica, cuyas dimensiones se pueden determinar empíricamente.

Ejemplo 3

40 Los oligonucleótidos, que contienen 45 bases y están modificados en un extremo con un grupo $\text{HS}-(\text{CH}_2)_6-$, se encuentran en forma de una monocapa auto ensamblada sobre una capa de oro o un alambre de oro. Estos oligonucleótidos sirven como moléculas de sondas y entran en conexión con moléculas analíticas o bien moléculas de acceso dado el caso presentes, en el caso de que sus secuencias de bases sean complementarias entre sí de una manera suficiente. De este modo se puede identificar la molécula de acceso como tal con una seguridad determinada. La capa de oro es en su propiedad como resistencia óhmica una parte de un circuito de corriente térmica. Esta capa de oro está conectada también con un circuito de medición electroquímico. Según la invención, esta capa de oro se encuentra junto con otras capas de este tipo sobre una base de vidrio, el soporte, y forma un electrodo de una matriz de análisis térmico. Los electrodos de la matriz se generan a través de pulverización o evaporación de oro sobre el sustrato de vidrio. En la figura 1 se representa una matriz de este tipo, que se compone de 16 elementos. La intensidad de la unión entre la molécula de sonda y la molécula de acceso depende, entre otras cosas, de la longitud de la molécula, del contenido de parejas de bases de guanina-citosina así como del grado de coincidencia entre la secuencia de sonda y la secuencia de acceso. Con una temperatura suficientemente alta se produce la separación de la unión. A través de la selección de la temperatura correcta se puede distinguir ahora entre moléculas con coincidencia alta y baja. Puesto que cada electrodo de la matriz se caracteriza por una secuencia de bases propia de las moléculas de sondas inmovilizadas sobre él, posee también su propia temperatura "correcta" para la distinción de moléculas totalmente complementarias y moléculas emparejadas erróneas. Según la invención, en este caso, se ajusta la temperatura para cada electrodo de la matriz individualmente sobre la corriente térmica respectiva y todos los electrodos son controlados juntos de forma centralizada por medio de un sensor de temperatura. De esta manera, se pueden compensar influencias térmicas exteriores como temperatura ambiente

oscilante o soluciones de muestra atemperadas diferentes.

Ejemplo 4

Un gran número de muestras se analizan con la ayuda de la técnica de hibridación según determinadas secuencias de ácido nucleico. La secuencia o bien es muy larga, o el número a determinar de secciones de la secuencia es muy grande, de manera que es necesario el empleo de una matriz-ADN. La matriz de análisis térmico equipada con moléculas de sondas apropiadas se puede emplear en este caso como detector en un aparato de flujo. Cada sonda individual se determina en un ciclo que está constituido por hibridación, transducción de la señal electroquímica y regeneración térmica. Durante la regeneración se separan las moléculas de sondas térmicamente de las moléculas de acceso a través de calentamiento sobre la temperatura de fusión de la secuencia de ácido nucleico respectiva. A continuación, la misma matriz está disponible para la siguiente muestra, con lo que es posible un volumen de muestras grande. La hibridación se realiza a una temperatura, que permite con alta selectividad, sólo con secuencias de acceso totalmente complementarias, la formación de los complejos híbridos.

Ejemplo 5

Otro ejemplo de aplicación es el análisis de proteínas. En la analítica-Proteom se plantea el problema de tener que caracterizar simultáneamente diferentes especies de proteínas, puesto que un proteom se caracteriza por el estado respectivo de todas las proteínas presentes y está sujeto a cambio temporal constante.

Las proteínas se pueden determinar a través de inmunoensayos, que se basan en reconocimiento molecular (Principio-Llave-Cerradura). Esto se puede realizar con la ayuda de una matriz de análisis según la invención simultáneamente a diferente temperatura adaptada a las especies respectivas.

Ejemplo 6

Una muestra acuosa debe investigarse sobre valor-pH, contenido de fluoruro, de glucosa y de plomo. Esto se puede realizar por medio de los métodos electroquímicos potenciometría, amperimetría y voltimetría inversa. También se puede emplear aquí una matriz de análisis sencilla calentada selectivamente con cuatro superficies de reacción (electrodos), todas las cuales están modificada de manera correspondiente. Está constituida por dos electrodos sensibles a iones para la determinación potenciométrica del valor-pH o bien del contenido de cloruro a temperatura ambiente, con un electrodo modificado con enzima para la determinación amperimétrica de glucosa a 40°C y con un electrodo de capa de carbón para la determinación voltimétrica inversa de plomo con una etapa de enriquecimiento a 80°C.

Ejemplo 7

La actividad de un enzima debe determinarse simultáneamente a temperaturas de 0, 10, 20, 30, 40, 50 y 60°C. A tal fin se utiliza una matriz de análisis, que está conectada con un elemento-Peltier para refrigeración. Las superficies de reacción se modifican con la enzima correspondiente y se llevan a una célula electroquímica. Con la ayuda del elemento-Peltier se reduce la temperatura inicial de la matriz a 0°C. A través de calentamiento selectivo se llevan las superficies de reacción individuales a las temperaturas deseadas entre 0 y 60°C. La actividad de la enzima se puede seguir después de la adición del sustrato con amperímetro sobre los elementos individuales de la matriz.

Presentación de los signos de referencia utilizados:

40	1	Superficie de electrodos
	2, 2'	Alimentación de corriente
	3	Soporte
	4, 4'	Capa decorativa
	5, 5'	Contacto de corriente térmica
45	6	Medio de reacción
	7	Borde de la superficie de reacción
	8	Eje longitudinal
	9	Sensor de temperatura
	10	Unidad de control
50	11, 11'	Conmutador
	12, 12', 12"	Resistencia
	13, 13', 13"	Electrodo
	14	Transformador

ES 2 628 804 T3

	15, 15', 15"	Voltímetro
	16, 16', 16"	Amperímetro
	17, 17', 17"	Regulador
	18, 18', 18"	Transmisor
5	19, 19', 19"	Contactos medios
	20, 20', 20"	Resistencias de ajuste
	21	Cuerpo de refrigeración
	22	Solución de muestra
	23	Elemento-Peltier
10	24	Superficie caliente del elemento-Peltier
	25	Superficie fría del elemento-Peltier

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Matriz de análisis con al menos un electrodo calefactable (13) sobre un soporte (3), para la analítica química o bioquímica, cuya superficie de electrodos (1) se lleva, respectivamente, a su propia temperatura, caracterizada por que al menos un electrodo (13) conductor de electricidad extendido alargado con contactos de corriente térmica (5, 5') en cada extremo del electrodo (13) y con moléculas de sondas sobre la superficie de los electrodos (1), está aplicado sobre el soporte (3), de manera que se garantiza una temperatura uniforme sobre toda la superficie de los electrodos (1), variando el área de la sección transversal del electrodo (13) extendido alargado transversalmente el eje longitudinal (8) del electrodo (13), que se extiende desde un extremo del electrodo extendido alargado con el contacto de corriente eléctrica térmica (5) hacia el otro extremo del electrodo extendido alargado con el contacto de corriente eléctrica térmica (5') o estando cubierto el extremo de la superficie de los electrodos en los contactos de corriente térmica con una capa de cubierta aislante térmica y eléctricamente.
- 10 2.- Matriz de análisis según la reivindicación 1, caracterizada por que la relación del área de la sección transversal del electrodo (13) extendido alargado entre área máxima y mínima de la sección transversal varía desde la relación mínima 1 a 1 hasta la relación máxima 1 a 3.
- 15 3.- Matriz de análisis según la reivindicación 1, caracterizada por que las conexiones para los instrumentos de medición electroquímica se realiza, respectivamente, en los contactos de corriente térmica (5, 5').
- 4.- Matriz de análisis según la reivindicación 1, caracterizada por que los electrodos individuales (13) están configurados, respectivamente, como alambre conductor eléctrico, como cinta o fibra.
- 20 5.- Matriz de análisis según la reivindicación 1, caracterizada por que los electrodos (13) extendidos alargados están realizados simétricos y en el centro está dispuesto adicionalmente un contacto menor (19) entre los extremos de los contactos de corriente térmica (5, 5') para la conexión de los aparatos de medición electroquímica.
- 6.- Matriz de análisis según la reivindicación 1, caracterizada por que la superficie (1) del electrodo (13) como superficie de reacción está ocupada con moléculas de sondas.
- 25 7.- Matriz de análisis según la reivindicación 1, caracterizada por que entre los electrodos (13) sobre el soporte (3) de la matriz está dispuesto al menos un sensor de temperatura (9) sobre la superficie de soporte como miembro de medición para el control de temperatura de los electrodos (13) y el sensor de temperatura (9) está conectado a través de una unidad de control (10) con una resistencia electrónica (12).
- 30 8.- Matriz de análisis según la reivindicación 1, caracterizada por que para la regulación de la temperatura individual de los electrodos individuales (13, 13', 13''), unos reguladores (17, 17', 17'') están conectados con resistencias (12, 12', 12'') para las corrientes térmicas y están conectados como miembros de medición con amperímetros (16, 16', 16'') y voltímetros (15, 15', 15'') para la medición de la resistencia de cada electrodo (13) individual.
- 9.- Matriz de análisis según la reivindicación 1, caracterizada por que los electrodos (13) individuales de la matriz tienen contacto directo o indirecto con la puerta respectiva de un transistor de efecto de campo asociado.
- 35 10.- Matriz de análisis según la reivindicación 1, caracterizada por que en las alimentaciones de corriente eléctrica (2, 2'), delante y detrás del electrodo (13) están dispuestos conmutadores dobles múltiples (11).
- 11.- Matriz de análisis según la reivindicación 1, caracterizada por que los electrodos (13, 13') individuales de la matriz están separados galvánicamente uno del otro y para la alimentación de la corriente térmica están dispuestos unos transmisores (18, 18') individuales.
- 40 12.- Matriz de análisis según la reivindicación 1, caracterizada por que la matriz está conectada para la refrigeración de la solución de muestra (22) con al menos un elemento-Peltier (23) o con un cuerpo de refrigeración pasivo (21).

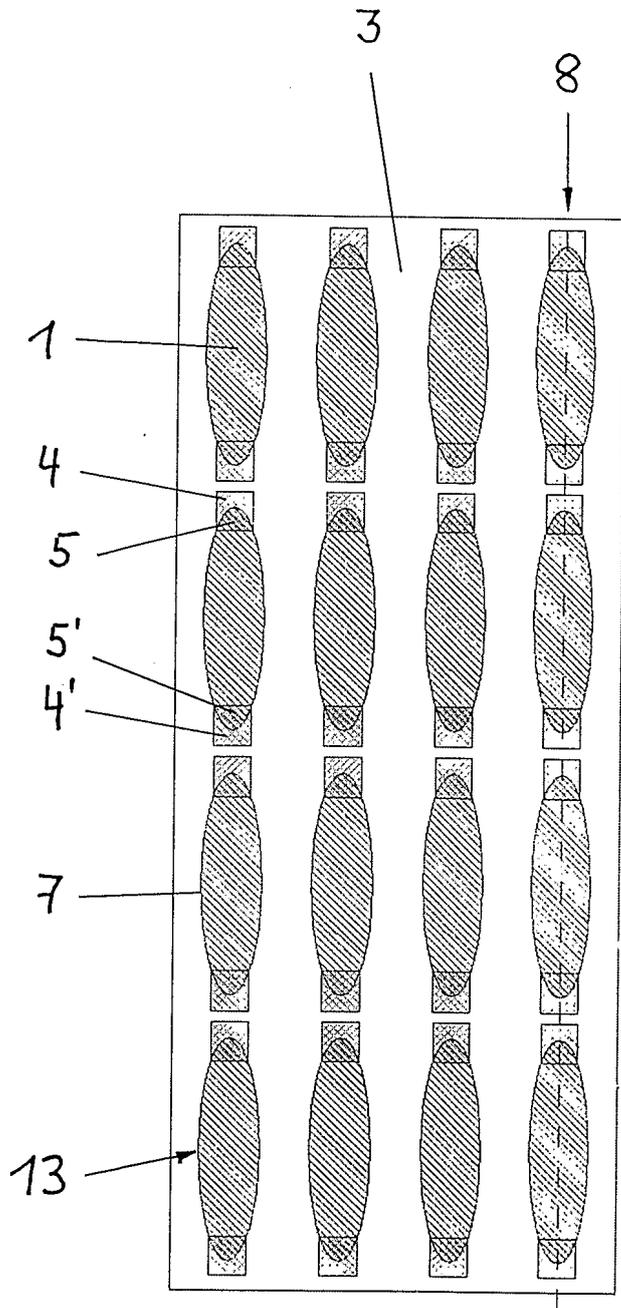


Fig. 1a

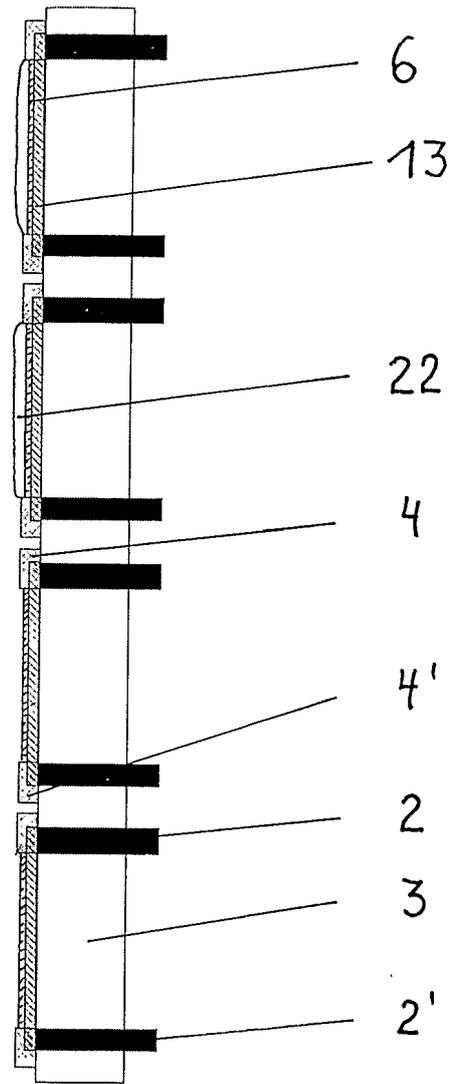


Fig. 1b

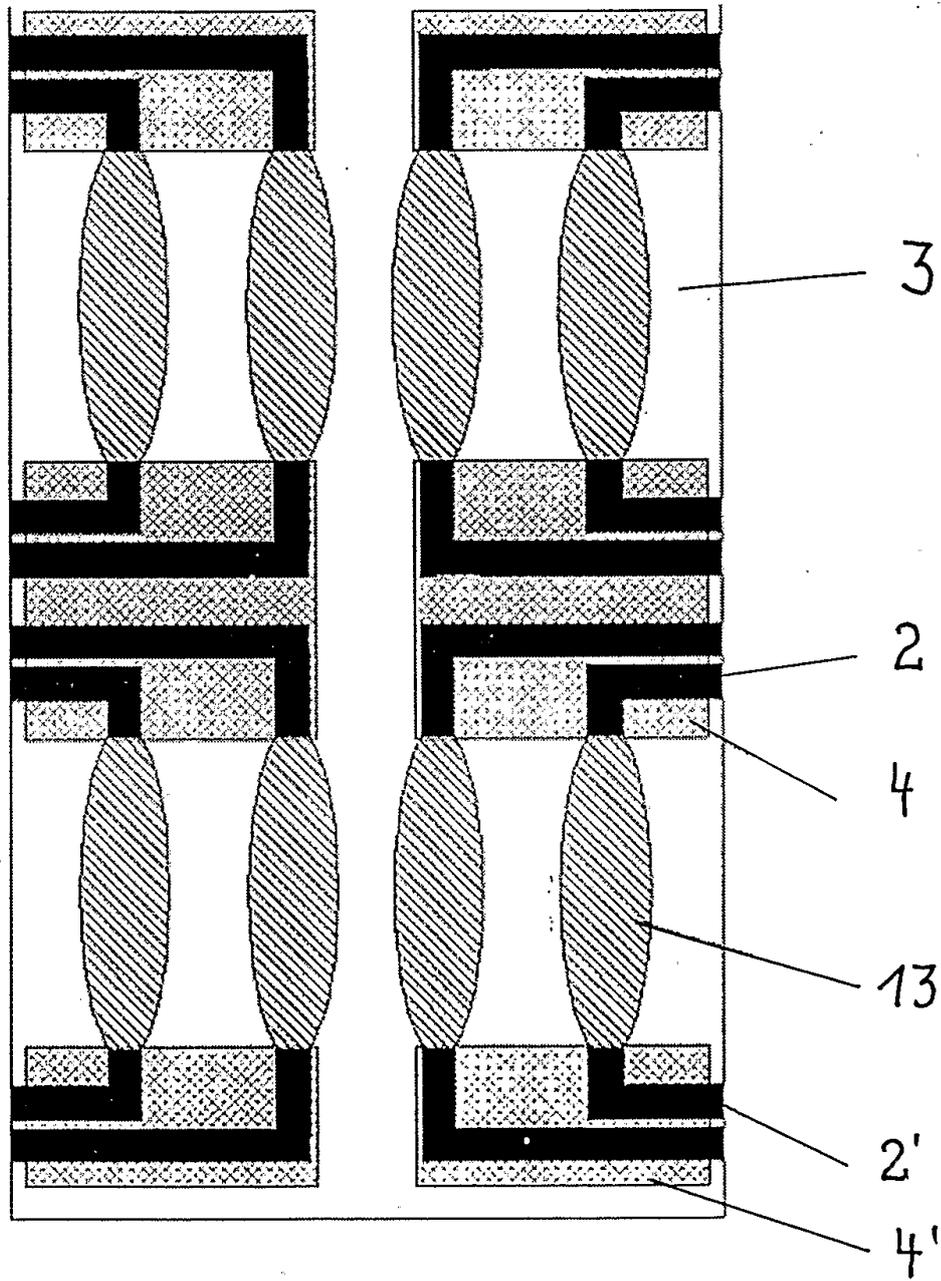


Fig. 2

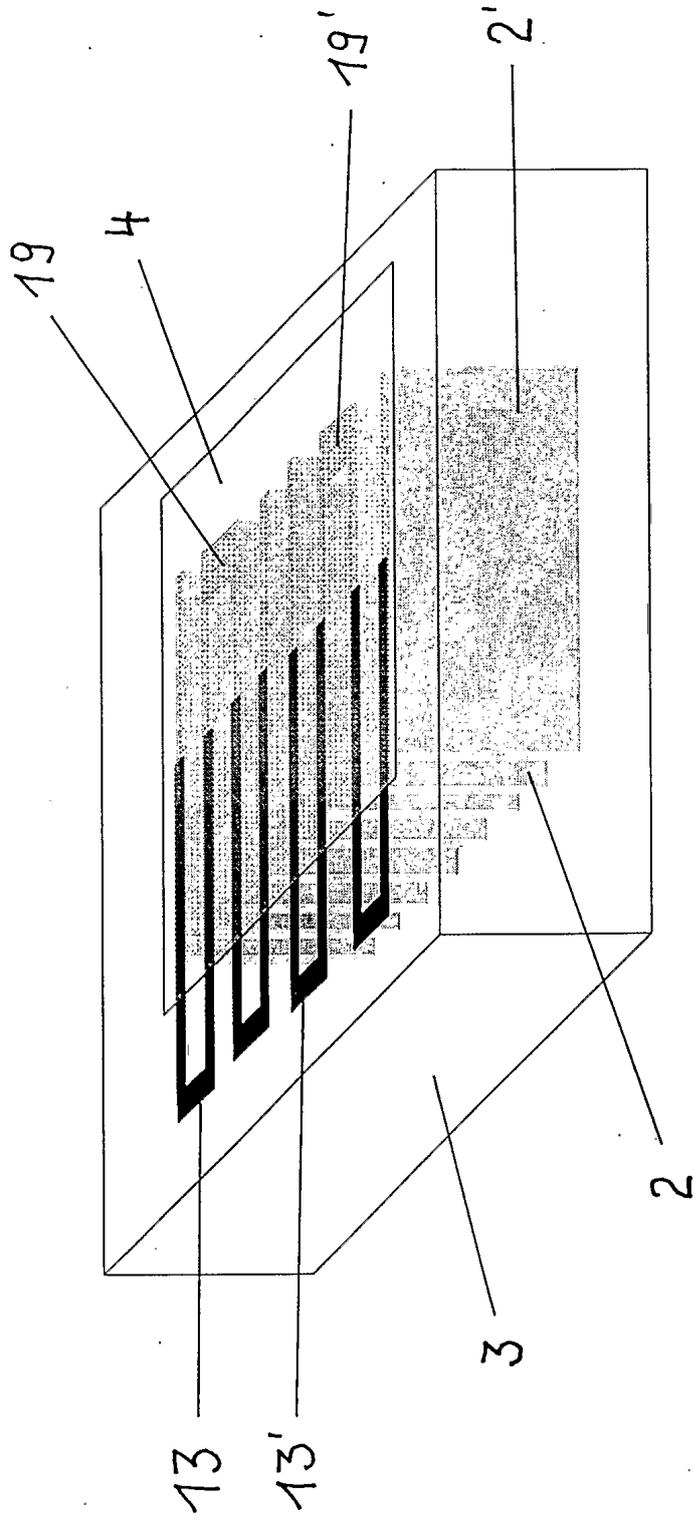


Fig. 3

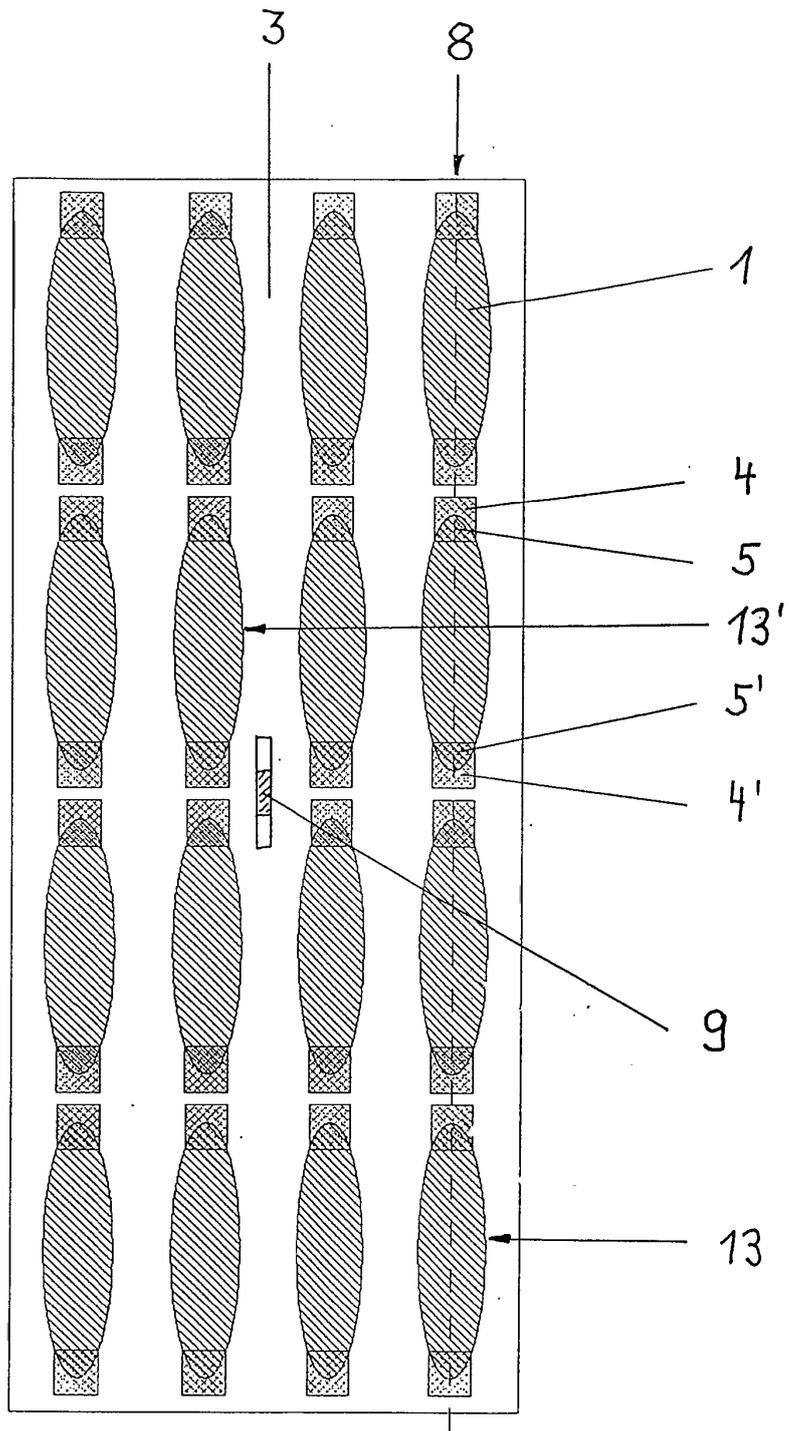


Fig. 4

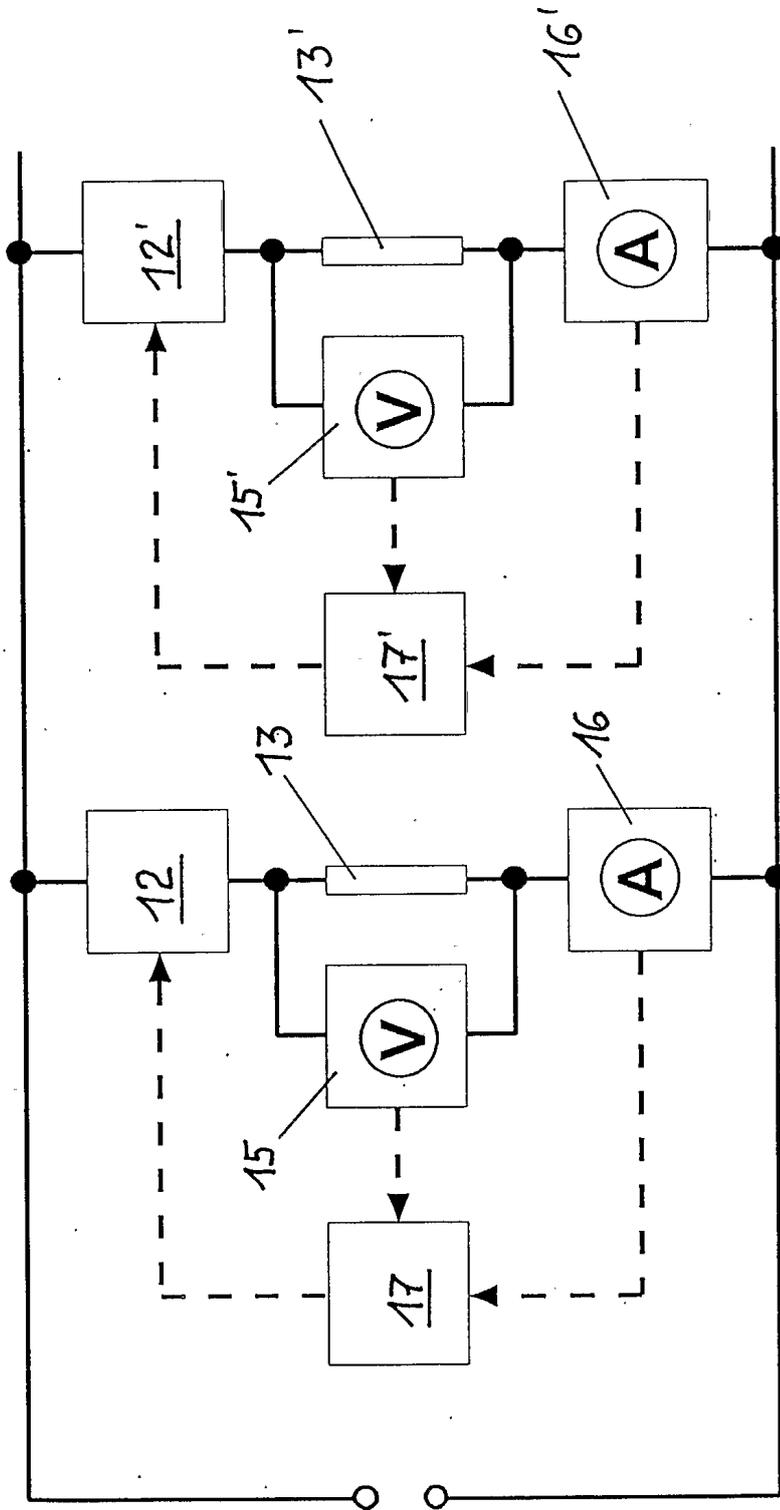


Fig. 5

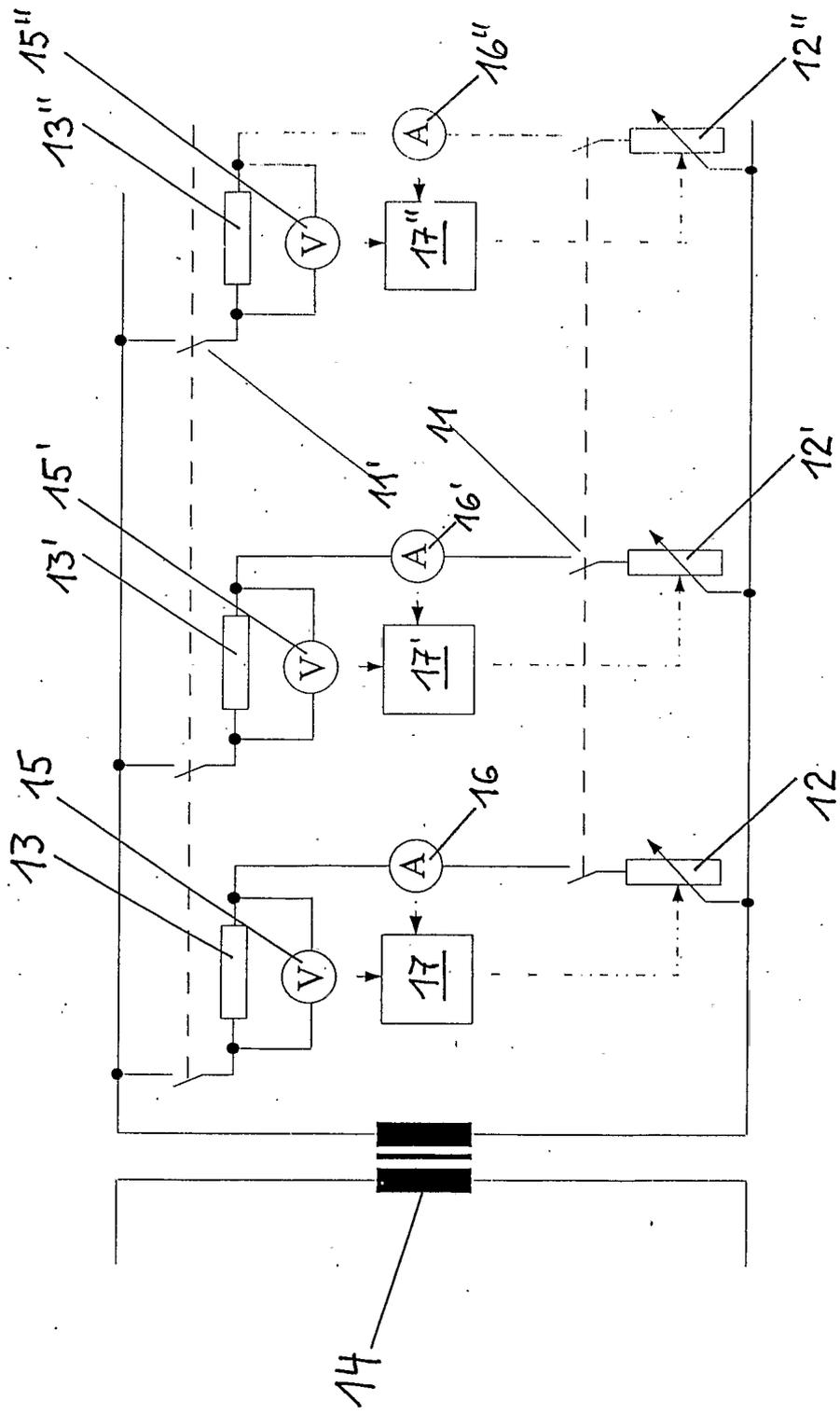


Fig. 6

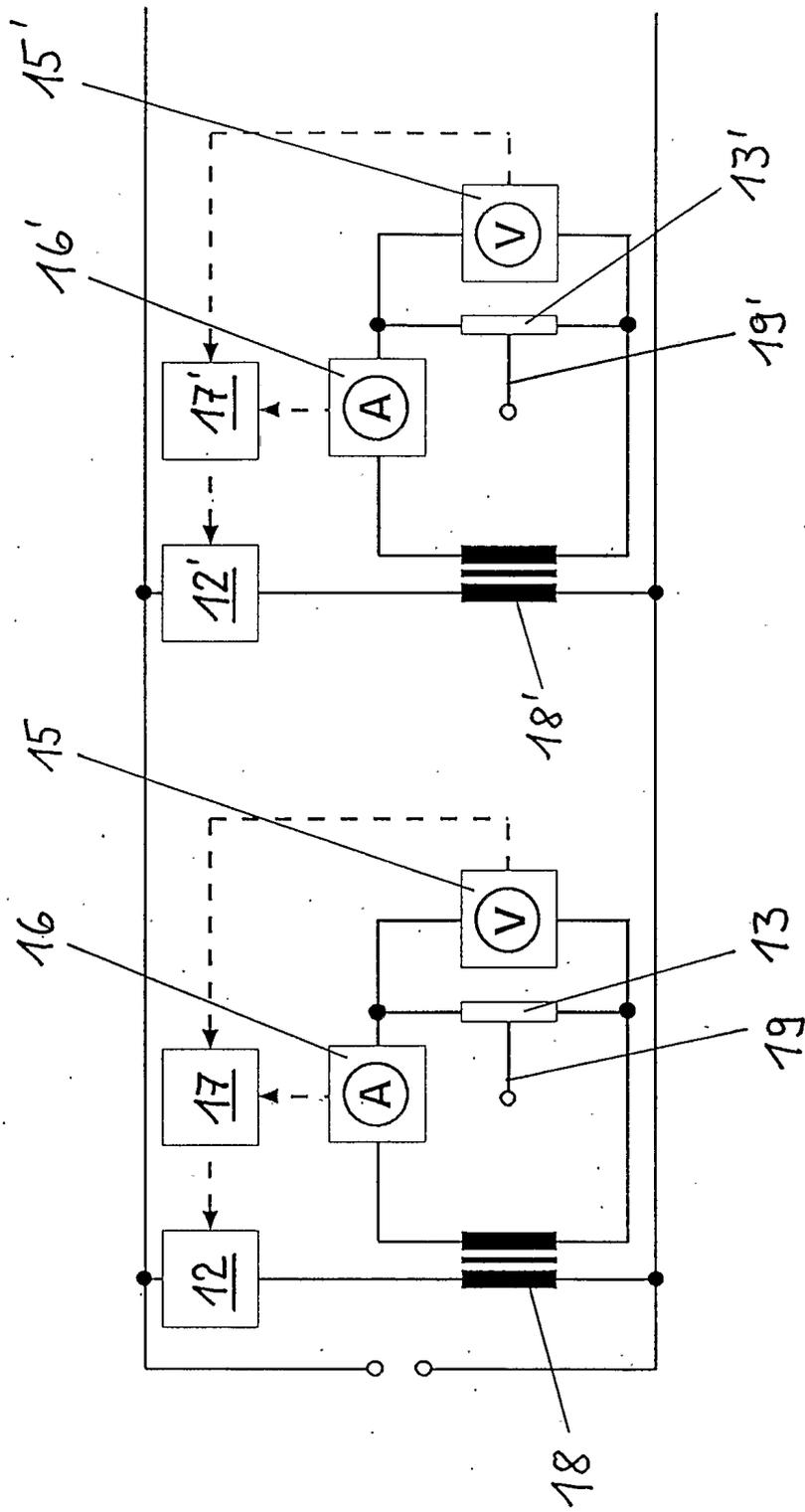


Fig. 7

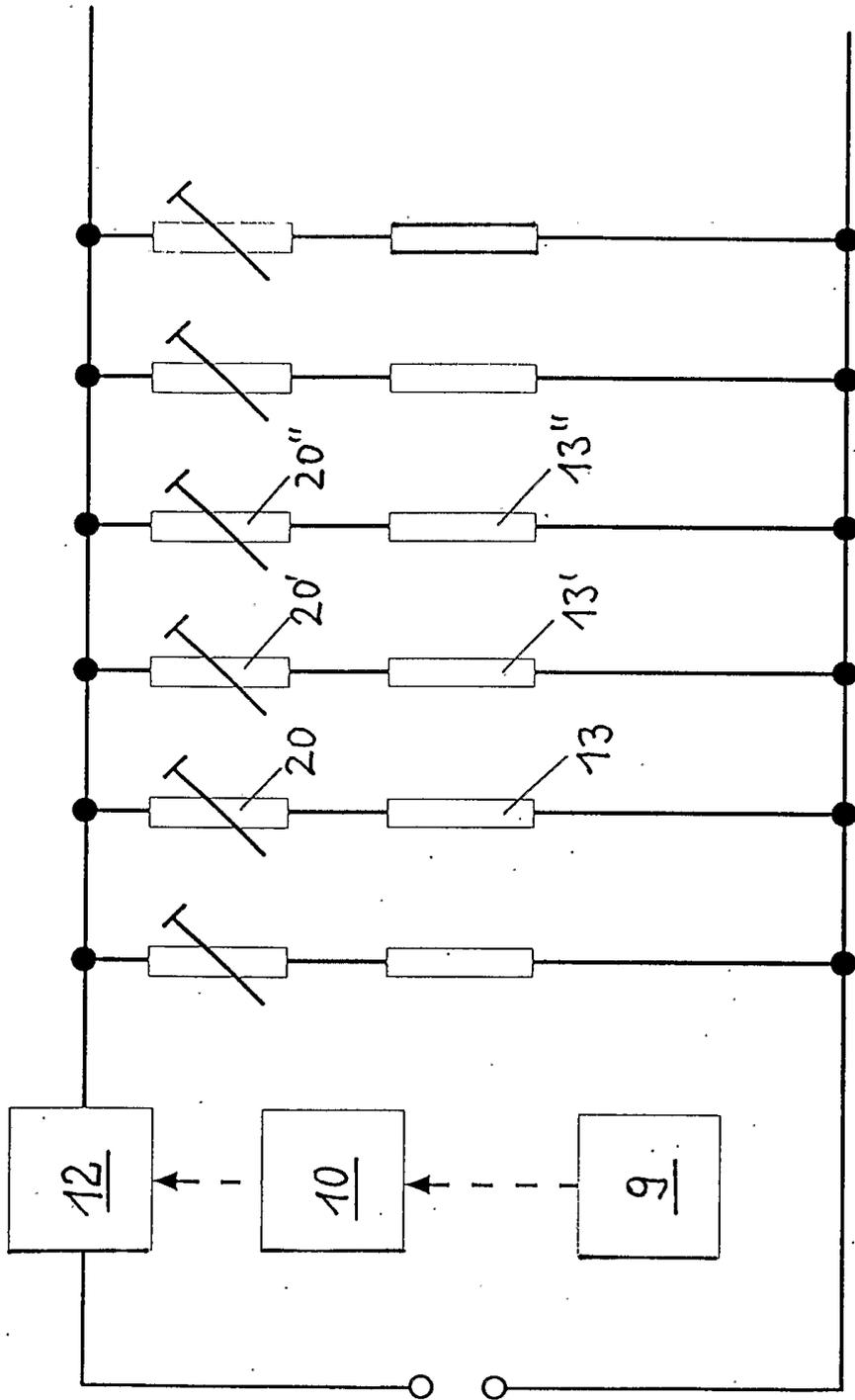


Fig. 8

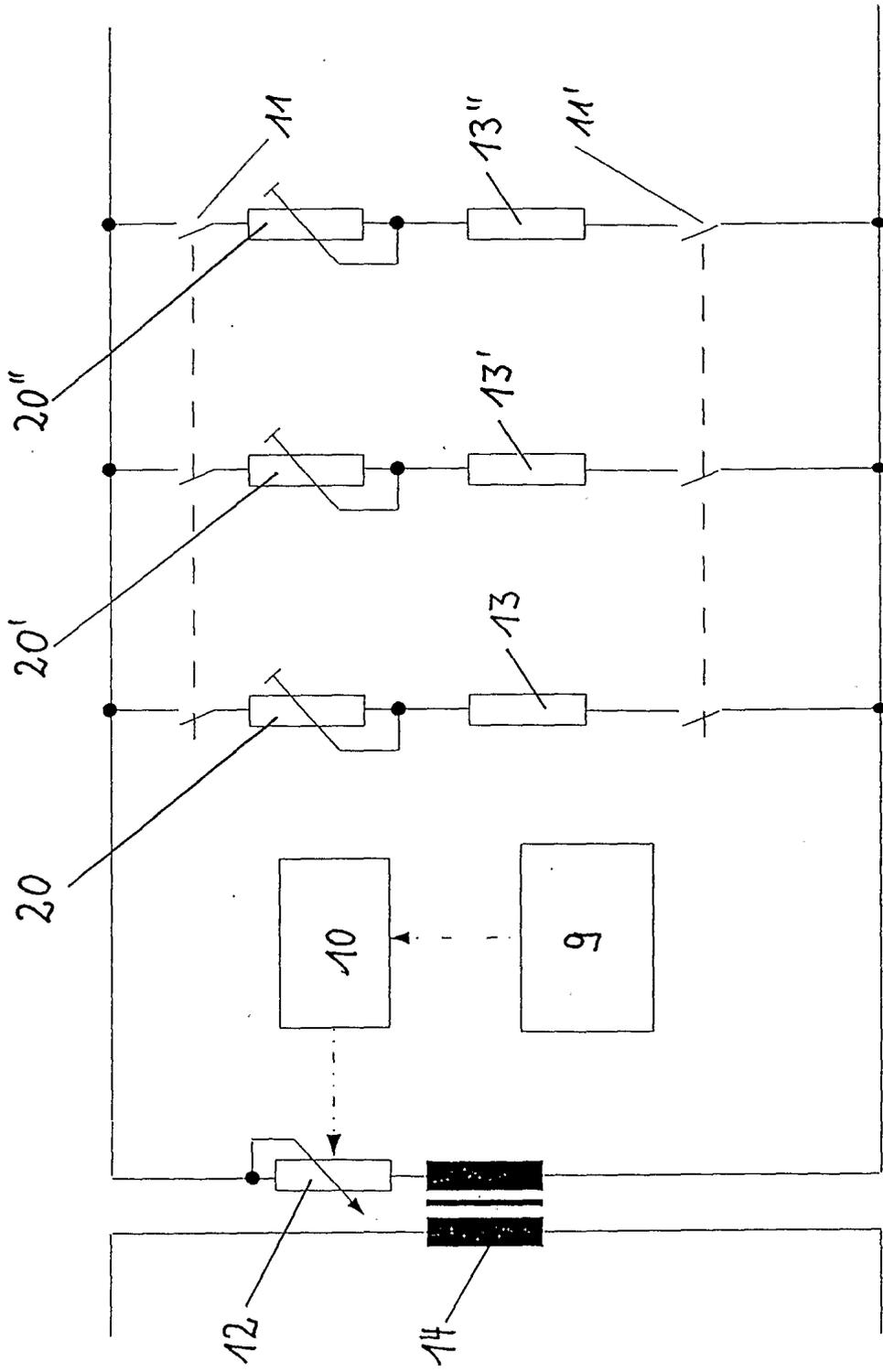


Fig. 9

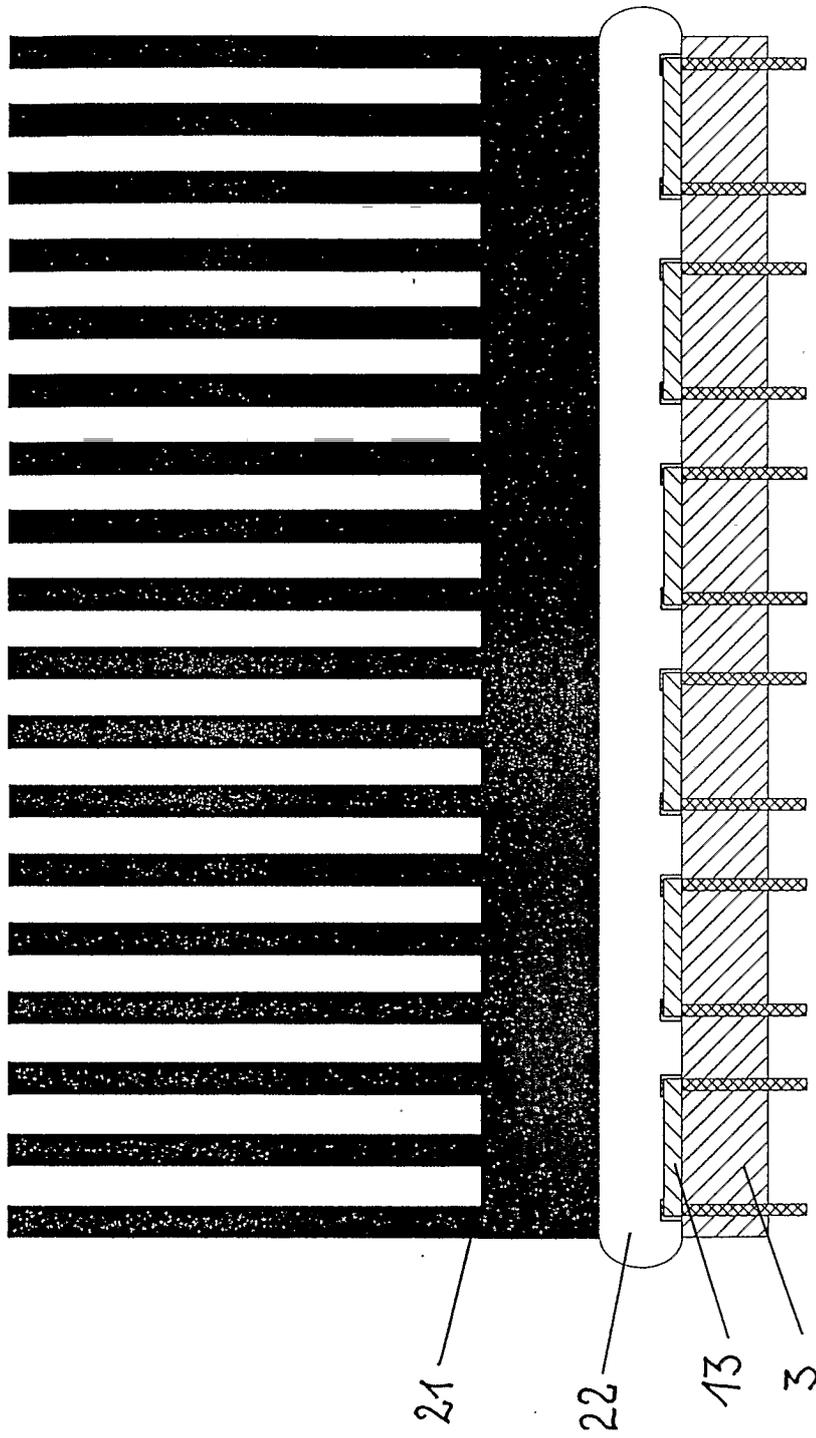


Fig. 11

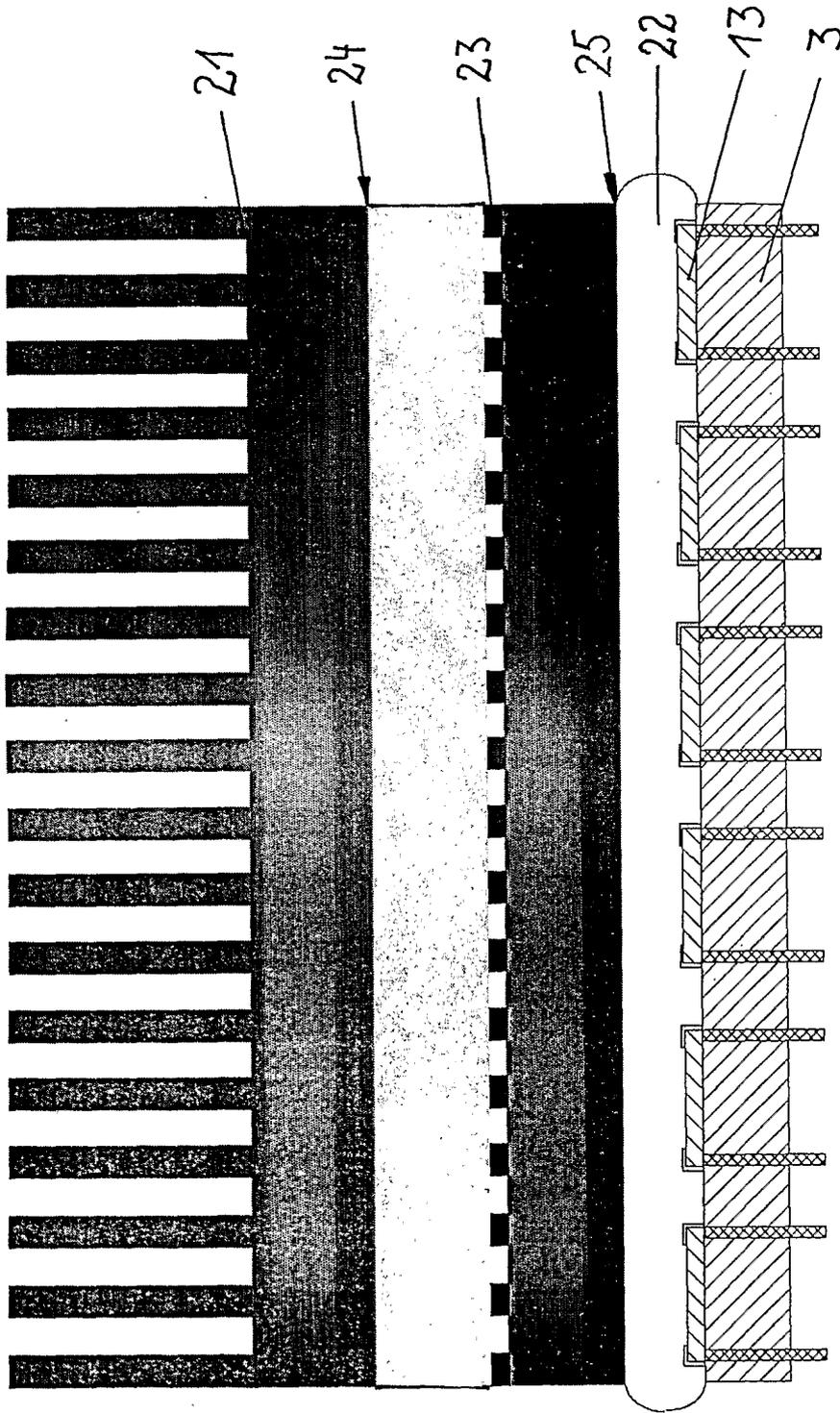


Fig. 12