

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 629 289**

51 Int. Cl.:

B01L 3/00	(2006.01)
B01L 7/00	(2006.01)
B29C 65/16	(2006.01)
B32B 27/00	(2006.01)
B01J 19/00	(2006.01)
B29C 65/00	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.11.2001 PCT/GB2001/05100**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **23.05.2002 WO02040158**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.11.2001 E 01983708 (7)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.04.2017 EP 1337336**

54 Título: **Placa de reacción**

30 Prioridad:

20.11.2000 GB 0028275

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.08.2017

73 Titular/es:

**LGC GENOMICS LIMITED (100.0%)
Queens Road Teddington
Middlesex TW11 0LY, GB**

72 Inventor/es:

**ICKE, RICHARD, GEOFFREY y
BRYDEN, BRIAN, GEORGE**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 629 289 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

Placa de reacción

5 La presente divulgación se refiere a una placa de reacción, un método de fabricación de la misma y un aparato de procesamiento automatizado de la placa de reacción.

10 Existen muchas circunstancias en las que deben efectuarse múltiples reacciones por lotes, tales como aplicaciones de Genotipificación, por ejemplo aplicaciones TaqMan™ (Applied Biosystems). Las amplificaciones de ADN mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o extensión del cebador es un método usado rutinariamente en genotipificación, como lo es el análisis SNP (Poliformismo de Nucleótido Único). Los blancos específicos de SNP son observados por medio de una placa de reacción ya sea desde el lado superior o el inferior (después de una etapa de amplificación PCR, extensión del cebador o hibridación) o se extrae una muestra o reactivo y se interpreta por medio de espectrometría, espectrometría de masas, secuenciación o hibridación. Estas reacciones en lotes son efectuadas en las placas de reacción. Estas placas de reacción han sido suministradas generalmente como placas de reacción de una sola pieza moldeada por inyección, con múltiples pocillos en forma de tubos de ensayo en miniatura formados en la misma.

20 La tecnología de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una importante herramienta de investigación en toda la biología molecular, tanto académicamente como en la industria farmacéutica. Las limitaciones del uso de tales reacciones han sido históricamente los altos costes resultantes del coste de los reactivos (particularmente la enzima) y los volúmenes relativamente altos que se necesitan en las placas de microtitulación; los volúmenes normales de los pocillos en los dispositivos de la técnica anterior podían ser de hasta 200 microlitros. Sin embargo, sería posible obtener resultados efectivos con placas que tuvieran volúmenes de pocillos tan pequeños como dos microlitros o menos. Hasta la fecha, sin embargo, no han llegado a conseguirse placas de reacción efectivas con un volumen de pocillo inferior a este tamaño.

30 Otro problema con el volumen relativamente grande de los dispositivos de la técnica anterior es que el exceso de espacio de aire en los pocillos de tales placas de reacción causa problemas de evaporación y condensación que pueden reducir la eficiencia de las reacciones. En ocasiones se usa aceite mineral encima de la reacción para prevenir/detener los problemas de evaporación/condensación (tapa de aceite). Sin embargo, esto puede dar lugar al problema de tener que deshacerse del aceite una vez que la reacción haya llegado a su fin. Sería deseable, por lo tanto, minimizar el tamaño del espacio de aire excesivo en las placas de reacción de pocillos múltiples para minimizar la evaporación o evitar la necesidad de la tapa de aceite.

35 En la técnica anterior se han utilizado placas de reacción moldeadas por inyección, de una o dos piezas, con menores tamaños de pocillos, algunas con hasta 1536 pocillos. Estaban fabricadas de poliestireno. Sin embargo, el problema con estas placas de reacción es que para que la PCR tenga éxito, la placa de reacción debe ser mecánicamente estable, y el poliestireno se deforma y se distorsiona a las altas temperaturas que normalmente se requieren para la PCR (aproximadamente 94 °C o 95 °C). Otro problema es que la base de la técnica anterior es compleja (placa en forma de "V" de polipropileno Genetix 1536). Esto dificulta hacer coincidir la base con una placa de transferencia térmica. Por lo tanto, cada pocillo de la placa de reacción no transferirá eficientemente a su interior el calor aplicado externamente, haciendo que las reacciones que dependen del calor sean menos fiables. Pueden darse variaciones en el calor transferido a los diversos pocillos de la placa de reacción. Sería deseable, por lo tanto, proporcionar una placa de reacción que permitiese que el calor fuera transferido fácilmente al interior del pocillo y cuya transferencia fuera uniforme. Parece que el uso del moldeo por inyección no permite formar fácilmente bases suficientemente delgadas para que se produzca tal transferencia.

50 Las placas de reacción de pocillos múltiples deberían tener una alta densidad de pocillos. En las placas de reacción convencionales de la técnica anterior se han venido suministrando matrices de, por ejemplo, 8 por 12 pocillos y 16 por 24 pocillos. Esto limita cada placa de reacción a 96 y 384 reacciones cada vez, respectivamente. Por lo tanto, sería deseable aumentar el número de pocillos con un volumen de reactivo mucho menor para permitir un turno de reacciones mayor a un coste menor.

55 Un problema adicional con las anteriores placas de reacción de pocillos múltiples es que generalmente se usan productos químicos externos en forma de cola, adhesivos disolventes, o similares, junto con presión, para sujetar a los pocillos una lámina de recubrimiento para cerrar los pocillos, por ejemplo para reducir las pérdidas de reactivo/muestra debidas a la evaporación. Las colas, tales como adhesivos disolventes, pueden causar también una reacción errónea dentro del pocillo.

60 La técnica anterior también enseña a soldar térmicamente una lámina sobre una placa de reacción para sellar los pocillos. El calor provoca la fusión de la cola térmica, así como del plástico (normalmente polipropileno) de la placa de microtitulación, creando así un sello soldado térmicamente. Sin embargo, las técnicas actuales de soldadura térmica no son adecuadas para el sellado de las placas de microtitulación de muy alta densidad y bajo volumen, que son útiles para implementar la presente invención, debido a que el calor procedente de la fuente calorífica se disipa dentro de los reactivos de la muestra.

Por lo tanto, sería deseable una nueva forma de placa de reacción, especialmente una que estuviese libre de cualquier agente adhesivo que pueda afectar a la reacción, para cumplir los protocolos conformes a la FDA.

Un uso adicional de tales placas de reacción es la genotipificación. La genotipificación es una vasta industria comercial. La mayoría de los métodos de genotipificación requieren un proceso de amplificación de ADN. También es aquí donde se producen la mayoría de los costes de proceso. Trabajando fiable y rutinariamente con bajos volúmenes de reactivo y con altas producciones, podría reducirse sustancialmente el coste por reacción. Sin embargo, los dispositivos de la técnica anterior no lo han conseguido con fiabilidad. Por esta razón, los costes ocasionados suelen ser de aproximadamente 0,5 dólares US por reacción. Sin embargo, esta cifra podría reducirse a 0,1 dólares US por reacción reduciendo el volumen del pocillo o de la reacción desde 10 microlitros hasta un volumen de uno o dos microlitros por reacción. La presente invención permite conseguirlo. Para dar una perspectiva de lo anterior, la escala de genotipificación requerida en una sola compañía farmacéutica puede alcanzar fácilmente 100 millones de reacciones al año, con un coste aproximado de 50.000.000 \$. Reduciendo el tamaño del volumen a solo dos microlitros, este coste podría reducirse potencialmente a 10.000.000 \$. (Estudios de enlace y asociación).

El conocido sistema de biotipificación TaqMan™ (Applied Biosystems) es un sistema aprobado por el gobierno para GMO (Organismos Modificados Genéticamente) y ensayos de guerra NBC (nuclear, biológica y química) en los Estados Unidos de América, así como los mayores marcadores de diagnóstico clínico de SNP. El sistema TaqMan 7700™ existente usa tecnología de placa de reacción de 8 por 12 (96) pocillos. Cada pocillo tiene un volumen de al menos 200 microlitros aproximadamente. Usando las placas de reacción de la presente invención, este podría reducirse a 2 microlitros, y menos. La actual placa de 96 pocillos del TaqMan 7700™ no funcionará con estos bajos volúmenes de muestra/reactivo debido a los problemas con el alto volumen interno. Además, la presente invención quizá podría aumentar la producción 16 veces debido a un mayor número de pocillos por placa de reacción a un coste asumible. La actual tecnología 7700™ sería incapaz de la alta producción requerida por la genotipificación farmacéutica debido al alto coste de los equipos y al alto coste de los reactivos.

Los actuales desarrollos en mapas de SNP (relacionados, por ejemplo, con Alzheimer, cáncer, enfermedades cardíacas, etc.) están creando un mercado para la detección en masa de desórdenes específicos. Esto podría involucrar la realización de mapas de SNP cuantificados sobre grandes grupos o poblaciones, o individuos, en la admisión de los hospitales o a nivel de medicina general. Estos mapas de SNP podrían buscar desórdenes únicos en grandes poblaciones o más a nivel individual mediante ensayo de grandes cantidades de blancos de SNP. Solo aumentando la producción y reduciendo los costes podría acometerse este ensayo extensivo. Sería deseable poder ensayar 10⁶ muestras al día.

Como ha ocurrido en las industrias electrónica e informática, la tendencia en instrumentación analítica, química y bioquímica ha sido hacia la miniaturización. En los análisis químicos y bioquímicos tal miniaturización, como la alcanzada, por ejemplo, por las placas de microtitulación de alta densidad de 1536 pocillos, proporciona numerosas ventajas. Estas incluyen una necesidad de reactivos significativamente menor, una producción más rápida, unos procesos fácilmente automatizables y, en muchos casos, una mejora de resultados/datos.

A título de ejemplo, las patentes estadounidenses Nº 5.498.392 y 5.587.128 describen la realización de reacciones de amplificación en dispositivos microfabricados incluyendo sistemas de flujo y/o cámaras de reacción a microescala. Tales sistemas reducen sustancialmente los requerimientos de los costosos reactivos utilizados en las reacciones de amplificación.

A pesar de las numerosas ventajas realizables con estas dos patentes estadounidenses, las ventajas suelen ser difíciles de obtener debido a problemas de manipulación por el usuario y de las interfaces del sistema.

Por lo tanto, sería deseable miniaturizar un número de reacciones en la huella común de una placa de microtitulación con muy bajos volúmenes de reacción. En particular, es deseable miniaturizar el proceso de amplificación en las PCR, y aumentar el formato de las placas de microtitulación a la más alta densidad posible con respecto a la actual placa de microtitulación de 384 pocillos.

Es preferible y normal que una placa de reacción adecuada para PCR esté compuesta de polipropileno. Adicionalmente, para la miniaturización del volumen de reacción, por ejemplo en una placa de 1536 pocillos, el sellado de los pocillos de la placa deberá ser extremadamente bueno. Esto es para evitar cualquier contaminación cruzada entre los pocillos y para impedir el escape de cualquier reactivo durante el proceso de PRC. También es deseable una estanqueidad al agua para minimizar la evaporación del volumen de reacción a las altas temperaturas involucradas.

Deberá observarse que, a pesar de estos incentivos, hasta ahora no se ha ideado ningún dispositivo de placa de reacción adecuado. Las posibilidades de placas de reacción con alta densidad de pocillos y bajo volumen de pocillo, por medio de la presente invención, permiten ampliar sustancialmente el campo de la genotipificación, usando las técnicas de ensayo químico, sólidas y aprobadas, ya establecidas en toda la comunidad científica.

El documento WO 94/12405 describe medios de cierre, recipientes y métodos de cierre, por ejemplo en relación con

dispositivos de contención de reactivos (RCD). Los medios de cierre pueden comprender una película multicapa y pueden aplicarse utilizando calor y/o presión.

5 El documento WO 00/64747 describe métodos, para fabricar un envase blíster, que pueden comprender poner en contacto una hoja base, que tiene un alveolo en la misma, con una hoja de cubierta y aplicar energía láser para formar una unión entre la hoja de cubierta y el alveolo blíster de la hoja base.

10 El documento 99/42608 se refiere a plataformas de ensayo de baja fluorescencia y métodos relacionados para el descubrimiento de medicamentos, por ejemplo una plataforma de pocillos múltiples para mediciones de fluorescencia, que comprende una pluralidad de pocillos dentro de un bastidor, cuya plataforma de pocillos múltiples tiene un fondo de baja fluorescencia.

15 La presente invención aborda los defectos del estado actual de la técnica, permitiendo el uso de la tecnología de placas de reacción de 1536 pocillos (y potencialmente una mayor densidad) para cualquier reacción que requiera una etapa de sellado o cierre de pocillos. Esta invención es de particular importancia en la miniaturización de la Reacción en Cadena de la Polimerasa y su uso en aplicaciones de Genotipificación.

20 La presente invención proporciona un método para formar un sello alrededor de una pluralidad de pocillos de una placa de reacción según se establece en las reivindicaciones.

25 La presente divulgación proporciona una placa de reacción que comprende un laminado plano de plástico soldado que consiste en una placa dotada de aberturas y una película, teniendo la placa dotada de aberturas al menos una superficie plana y una pluralidad de aberturas en la superficie plana de la placa dotada de aberturas, y estando la película unida por soldadura a la superficie plana de la placa dotada de aberturas alrededor de la, o de cada, abertura.

Preferentemente, cada abertura define un recipiente, junto con la película.

30 Preferentemente, la película cubre todas las aberturas, extendiéndose más preferentemente sobre la totalidad de la superficie plana de la placa dotada de aberturas.

Preferentemente, la placa de reacción comprende el laminado plano de plástico soldado cuando la placa está en su estado no usado.

35 Aunque las aberturas pueden extenderse solo parcialmente a través de la placa dotada de aberturas, preferentemente la, o cada, abertura se extiende desde una primera superficie plana de la placa dotada de aberturas hasta una segunda superficie plana opuesta. Puede soldarse una segunda película a la segunda superficie, por ejemplo para sellar o cerrar el(los) recipiente(s) formado(s) por la(s) abertura(s) y la primera película.

40 Preferentemente, la pluralidad de aberturas está dispuesta en una matriz. Preferentemente la separación entre los centros de las aberturas es de 2,25 mm.

45 Pueden proporcionarse canales o ranuras, en particular ranuras o micropistas superficiales, en las placas dotadas de aberturas para poder utilizar los métodos de esta divulgación para sellar uno o más microcanales, series de canales, o depósitos, soldando una película a una superficie plana lisa que contenga dichas estructuras, preferiblemente por soldadura láser. Tales canales o ranuras permitirán la comunicación de fluidos entre aberturas adyacentes, por ejemplo. Deberá observarse que la soldadura láser simplifica la creación y el sellado de las micropistas en comparación con la micromecanización y la fotolitografía.

50 Preferentemente, el otro lado de la placa de reacción es plano. No obstante, la placa de reacción puede adoptar la forma de una matriz de minitubos de ensayo como los proporcionados en la técnica anterior (véase, por ejemplo, la Figura 7). Preferentemente tales tubos de ensayo serán todos del mismo tamaño y longitud.

55 Preferentemente, la soldadura de la presente divulgación se efectúa por soldadura por transmisión, por ejemplo soldadura láser.

Para la soldadura láser puede usarse un láser capaz del calentamiento localizado de la superficie de la placa hasta una temperatura que funde el material plástico de la placa y la película.

60 El láser deberá tener tal potencia, y estar controlado con tal precisión, que no dañe cualesquiera reactivos o muestras que pudieran haber sido depositados en los pocillos de reacción. Las reivindicaciones requieren que la soldadura sea soldadura láser por diodo de infrarrojo cercano.

65 La soldadura puede comprender soldadura por cola caliente (por ejemplo una unión activada térmicamente) en la que se funde una cola, por ejemplo con un láser, de manera que se vuelva pegajosa para unir la película a la placa.

Estas y otras formas de soldadura por transmisión permiten cerrar aberturas más pequeñas que con las técnicas de soldadura térmica convencional, puesto que el calor es enfocado con precisión sobre la superficie dotada de aberturas y no es absorbido en el reactivo o la muestra. Los contenedores o pocillos más pequeños que pueden obtenerse con estos procesos de soldadura de precisión permiten una reducción de los volúmenes de pocillo, en comparación con los dispositivos de la técnica anterior. Esto permite que el volumen de fluido esté en una proporción mayor con respecto al volumen de contención del pocillo sin ser un volumen enormemente excesivo de reactivo, es decir, un desperdicio de costosos reactivos y componentes, como se requeriría en los dispositivos de la técnica anterior para conseguir el mismo efecto; un gran espacio de aire permite una evaporación excesiva del reactivo, lo cual es indeseable.

Preferentemente, para un volumen de líquido de 2 microlitros, el volumen de contención de la abertura es de solo 4 microlitros. Los dispositivos de la técnica anterior usaban quizás una muestra de 3 microlitros frente a un volumen de contención de 100 microlitros. Adicionalmente, bajar los volúmenes de reactivo tiene la ventaja de ahorrar costes. Más adicionalmente, permite aumentar el número de aberturas en un tamaño dado de placa de reacción, lo que permite alcanzar perfectamente una mayor producción de ensayos con bajos volúmenes de reactivos. Esto también aumenta el número de ensayos disponibles cuando solo se dispone de una muestra original limitada, por ejemplo de ADN o ARN, para trabajar con la misma.

Preferentemente, la placa de reacción está formada solo por materiales químicamente estables, por ejemplo polímeros tales como polipropileno o policarbonato. El polipropileno es particularmente adecuado porque es moldeable por inyección, inerte con respecto a los reactivos, térmicamente estable a las temperaturas de reacción, por ejemplo entre 0 °C y 95 °C, y buen conductor térmico para que el calor pueda ser transferido a la abertura a través del mismo. También puede ser ópticamente transparente, lo cual es útil para el análisis fluorescente de la post-detección de la muestra de reactivo.

Otra ventaja es que el polipropileno puede soldarse, y tras la soldadura tiene una interferencia mínima con los pocillos de reacción adyacentes, debido al efecto de sellado de la soldadura alrededor de cada pocillo de reacción. La técnica anterior solo consigue una base transparente uniendo una base transparente más gruesa, ya sea en la etapa de moldeo por inyección o más tarde, que no está soldada y que puede permitir interferencias.

Más adicionalmente, el polipropileno es capaz de un alto flujo térmico y puede ser suministrado en películas de un espesor deseado, por ejemplo entre 1 y 500 micrómetros, preferentemente entre 10 y 120 micrómetros, y más preferentemente 2 micrómetros aproximadamente. También puede ser congelado con fines de almacenamiento, por ejemplo enfriado a temperaturas de -20 °C y -70 °C.

También puede conseguirse una reticulación polimérica en la soldadura, por ejemplo fundiendo las superficies encaradas de la placa y la película de manera que se fusionen entre sí, especialmente si los dos componentes unidos están formados por el mismo material plástico, aunque también pueden soldarse materiales distintos. La reticulación proporciona una soldadura de gran resistencia y eficiencia. No obstante, puede ser suficiente fundir simplemente una capa de cola entre la película y la placa con el soldador, de manera que la cola suelde (pegue) la película y la placa entre sí. La capa de cola puede aplicarse ya sea a la película o a la placa, pero preferentemente a la película.

Preferentemente, la placa dotada de aberturas tiene una sección maciza, aparte de las aberturas. No obstante, si está formada por una matriz de minitubos de ensayo, por ejemplo montados dentro de un bastidor, los tubos deberán estar interconectados por una rejilla para formar la placa dotada de aberturas. Sin embargo, al menos un lado de la placa dotada de aberturas debe tener una superficie plana para recibir la película; en uso, la placa de reacción será calentada generalmente sobre una placa caliente que tenga una superficie plana por medio de la cual el calor pueda ser transferido, a través de la película, hasta una muestra contenida en los contenedores o pocillos definidos por las aberturas. Para conseguirlo, es posible que deba invertirse primero la placa de reacción para que la muestra repose contra la película por gravedad, y luego la película descansa sobre la placa caliente.

Alternativamente, el calor para el proceso puede ser transferido a la placa dotada de aberturas por inmersión total en baños de agua, para conseguir la reacción deseada. Para ello se sujetarán generalmente las placas de reacción en un soporte adecuado.

Preferentemente, la película está formada por un material plástico transparente. Preferentemente, la película es ópticamente translúcida con muy baja distorsión o interferencia. Esto permite la inspección tanto manual (es decir, humana) como automática (es decir, a máquina) de cada PCR, por ejemplo. Sin embargo, para sensores que operen, por ejemplo, utilizando sensación UV o IR, es decir, fuera del espectro visible, la película solo tiene que ser transparente para la longitud de onda electromagnética apropiada que se utilice. El uso de soldadura láser para sujetar la película también aumenta (mejora) la relación entre señal de imagen fluorescente y ruido, debido a los mejores parámetros ópticos que se obtienen con la película así sujeta en comparación con la soldadura térmica debido a las propiedades ópticas simplificadas de la placa de reacción plana.

La película es preferentemente un laminado. Por ejemplo, puede tener una capa superior de poliéster, un centro de

polipropileno y una capa inferior de cola termofusible para unir a la placa.

Preferentemente, la placa dotada de aberturas es sustancialmente rígida y opaca, y está fabricada con material plástico.

5 Preferentemente, la placa dotada de aberturas es de un material adecuado para absorber infrarrojos (IR) (por ejemplo, negro) para facilitar la soldadura por transmisión.

10 La placa dotada de aberturas puede fabricarse con un material no adecuado para absorber infrarrojos (IR), mientras que el material de la película será adecuado para absorber infrarrojos con el fin de facilitar la soldadura por transmisión. Esto permite que el láser efectúe la soldadura de la película a la placa a través de la placa plana dotada de aberturas.

15 La placa dotada de aberturas puede fabricarse con un material no adecuado para absorber infrarrojos (IR) que inhiba la soldadura por transmisión, pero puede ser recubierta con tinte absorbente para facilitar la soldadura por transmisión. El tinte puede ser una tinta aplicada, por ejemplo, con un marcador, o similar, para definir las localizaciones en las que se requiere soldadura.

20 Preferentemente, la placa dotada de aberturas es negra. Esto es para evitar en los aparatos de inspección automatizados interferencias cruzadas con, por ejemplo, las PCR de pocillos adyacentes. En caso contrario la placa dotada de aberturas podría absorber la luz a la frecuencia relevante de la radiación EM usada por el equipo de inspección automatizado. La absorbancia también evita que los reflejos internos dentro de la abertura, procedentes por ejemplo de las paredes laterales de la misma, interfieran con la inspección automatizada.

25 En uso, uno o más reactivos y una o más muestras (multiplexadas) estarán retenidos por la película o películas dentro de la, o de cada, abertura. Preferentemente, la película es fácilmente perforable para que el reactivo y la muestra, por ejemplo en forma líquida, puedan ser retirados del interior de la abertura, si se requiere.

30 Preferentemente, la soldadura alrededor de la abertura es continua para sellar la película a la placa dotada de aberturas alrededor de la periferia del orificio al final del mismo. No obstante, cuando se proveen canales o ranuras, la soldadura será entonces preferentemente continua a lo largo de la periferia de los canales o ranuras y de las aberturas conectadas por los mismos.

35 Preferentemente, la placa dotada de aberturas tiene menos de 4 mm de espesor. Por ejemplo, la placa dotada de aberturas puede tener aproximadamente 0,2 mm de espesor, aproximadamente 0,5 mm de espesor, aproximadamente 1,3 mm de espesor, aproximadamente 2 mm de espesor o aproximadamente 3 mm de espesor. Tales placas delgadas dotadas de aberturas pueden formarse o cortarse a partir de bandas continuas, por ejemplo un rollo de material dotado de aberturas. Esto procuraría ventajosas características de manipulación en un aparato automatizado de fabricación y procesamiento y podrían conseguirse producciones más elevadas.

40 Las aberturas pueden tener una sección transversal circular y una longitud correspondiente al espesor de la placa dotada de aberturas (es decir, extendidas perpendicularmente a la superficie de la misma). Preferentemente las aberturas tienen un diámetro de 1,8 mm. Cada abertura tiene pues un volumen interno de aproximadamente 3,36 microlitros cuando su longitud es de 1,32 mm. La Figura 8 muestra tal construcción.

45 Cada abertura puede ser sustancialmente troncocónica, es decir, con un diámetro de 1,8 mm en una superficie plana (por ejemplo, la superior) y 0,2 mm en la superficie opuesta (por ejemplo, la base). Alternativamente, las aberturas pueden tener una sección transversal cuadrada. Un ejemplo, con unas aberturas cuadradas de 1,8 mm, define unas aberturas que tienen cada una un volumen interno de 4,27 microlitros cuando su longitud es de 1,32 mm.

50 Las aberturas pueden ser cónicas, por ejemplo con el fondo en V, sin extenderse totalmente a través de la placa, según se muestra en la Figura 9.

55 Preferentemente, la placa tiene 3 mm de espesor, con pocillos de 2,5 mm de profundidad que pueden ser, por ejemplo, cónicos, troncocónicos, cuadrados o tubulares, teniendo cada uno una pared de fondo de 0,5 mm de espesor. Preferentemente la placa está moldeada por inyección y tiene una separación de 2,25 mm entre los centros de las aberturas. Los pocillos tienen 1,8 mm de ancho.

60 La longitud de las aberturas, es decir, normalmente el espesor de la placa dotada de aberturas, puede ser utilizada para variar el volumen de las aberturas, como puede serlo el diámetro de las aberturas. Un volumen de abertura deseable sería igual o inferior a 4 mm.

65 De acuerdo con un segundo aspecto de la presente divulgación, se proporciona un método para formar una placa de reacción, de acuerdo con el aspecto preferido de la presente divulgación, que comprende proporcionar una placa dotada de aberturas y una película y soldar la película a la placa dotada de aberturas para formar el laminado plano

de plásticos soldados.

5 También se proporciona un método para cerrar una abertura de una placa de reacción que comprende soldar por transmisión una película sobre una placa dotada de aberturas que tiene una superficie plana lisa y al menos una abertura que se extiende desde la superficie plana lisa hacia el otro lado de la placa de reacción, cerrando la película la abertura por el extremo de la superficie plana lisa de la misma.

Preferentemente, la placa de reacción comprende cualquiera de las características anteriormente definidas.

10 Cuando las aberturas se extienden totalmente a través de la placa dotada de aberturas, la película puede cerrar cualquier extremo de las mismas. Preferentemente, una primera película cierra el primer extremo y una segunda película cierra el segundo extremo. Preferentemente ambas películas son soldadas por transmisión a la placa dotada de aberturas.

15 Preferentemente, la soldadura es soldadura de transmisión por láser de diodo.

20 Una placa de reacción de doble lado que haya sido sellada por transmisión sobre una primera superficie (una sola placa de reacción sellada por transmisión) puede ser sellada sobre la segunda superficie con una cinta adecuadamente compatible con PCR que se fije a una superficie plana de la placa durante el proceso con temperatura.

25 Preferentemente, la abertura se llena al menos parcialmente con una cantidad de uno o más de un reactivo y una muestra, y la película o películas cierran y sellan la abertura con el reactivo y la muestra contenidos así en la abertura. La abertura así sellada, conteniendo el reactivo y/o la muestra, puede ser usada para el almacenaje en masa de muestras/reactivos (es decir, bibliotecas de compuestos, muestras de ADN de población o sondas de SNP en masa).

30 Preferentemente, las placas dotadas de aberturas parcialmente rellenas de reactivos/muestras de ADN o sondas de SNP pueden ser almacenadas en estado seco o húmedo para después ser recuperadas y reconstituidas para su distribución o uso. La soldadura láser (usando infrarrojo cercano, ND YAG o diodo) de la(s) película(s) a la placa dotada de aberturas permite que cantidades mínimas de energía/calor penetren en la mezcla de reactivo y muestra, por ejemplo una muestra de fluido/compuesto, durante la etapa de soldadura por transmisión. Esto es lo contrario de lo que sucedería con la soldadura térmica convencional; la fusión de una lámina recubierta de cola para pegarla a una superficie plana requiere un espacio de aire aislante entre la película y la mezcla de reactivo y muestra. Usando la soldadura térmica convencional, la superficie soldada, que incluye la tapa de la abertura, generalmente se pone caliente al tacto tras la soldadura. Esto es desventajoso. La presente invención simplifica por lo tanto el proceso de soldadura y disminuye la posibilidad de cualquier degradación prematura e inintencionada de los reactivos o muestras provocada por el proceso de soldadura, o el calor residual de la misma, ya que localiza el calentamiento.

40 La presente divulgación proporciona adicionalmente un método para formar un sello, alrededor del pocillo de una placa de reacción o microtitulación, que comprende la etapa de soldar por láser una película de plástico sobre el pocillo para formar el sello. La soldadura láser puede provocar que la película se fusione alrededor del pocillo o, con cola térmica entre la película y la placa, se pegue alrededor del pocillo. La película está preferentemente recubierta de tal cola por su lado encarado hacia la placa.

45 De acuerdo con este y otros aspectos de las presentes invención y divulgación, preferentemente se cierra la totalidad de la placa usando soldadura láser y la película de plástico.

50 La película puede estar recubierta por un reactivo de afinidad, que preferentemente es estreptavidina.

Preferentemente, la película está recubierta por un producto químico usado en una reacción para la cual deberá usarse la placa de microtitulación. Las paredes de los pocillos pueden estar recubiertas similarmente.

55 La presente divulgación proporciona adicionalmente un aparato automatizado de procesamiento de placas de reacción para el procesamiento automatizado de una placa de reacción, incorporando el aparato unos medios para llevar a cabo el, o cada, método anteriormente descrito.

60 El aparato puede ser simplemente para aplicar una película a una placa dotada de aberturas. La placa dotada de aberturas puede tener ya una primera película aplicada a la misma y reactivos y/o muestras en las aberturas. No obstante, el aparato puede ser para soldar una primera película a una placa dotada de aberturas.

65 El aparato puede comprender medios para rellenar la, o cada, abertura al menos parcialmente con un reactivo y una muestra, tales como medios para rellenar conocidos en la técnica anterior, por ejemplo, inyectores de jeringa robóticos, dispensadores piezoeléctricos, dispensación por aguja, bombas peristálticas, dispensadores de desplazamiento positivo o dispensadores capilares.

El aparato puede comprender medios para sujetar la, o cada, placa dotada de aberturas en el momento de la soldadura, por ejemplo, usando un lecho de vacío, para permitir una precisa soldadura por transmisión.

5 Preferentemente, el aparato rellena las aberturas de una placa dotada de aberturas que tiene una primera película soldada a la misma con muestra y/o reactivo. Preferentemente, el aparato cierra y sella entonces las aberturas soldando una segunda película a una superficie plana de la placa de reacción opuesta a la superficie a la cual está soldada la primera película.

10 Preferentemente, el aparato comprende una o más unidades de soldadura láser por diodo para soldar la(s) película(s) a la placa dotada de aberturas.

15 El aparato puede comprender también una unidad de moldeo por inyección para formar placas dotadas de aberturas. Alternativamente, las placas dotadas de aberturas pueden ser proporcionadas como piezas en bruto. La, o cada, abertura puede ser formada después por el aparato en, o a través de, las piezas en bruto, por ejemplo por taladrado, corte por láser, grabado o fresado. Preferentemente, sin embargo, las placas dotadas de aberturas son suministradas al aparato listas para soldar a las mismas la película o películas. Estas placas dotadas de aberturas pueden estar, por ejemplo, en estado de fundición o de moldeo.

20 Las películas pueden ser desenrolladas de un rollo de material de película o precortadas a su tamaño.

Preferentemente, la, o cada, película está fabricada de polipropileno, y puede ser de polipropileno con una capa de cola térmica.

25 El aparato puede comprender también medios para llevar a cabo reacciones usando las placas de reacción, por ejemplo, manipuladores de placas de reacción y medios de calentamiento para aplicar calor al reactivo y a la muestra dentro de las aberturas por medio de conducción y o transmisión a través de la película. Puede que los manipuladores tengan que girar las placas de reacción para posicionar el lado apropiado de las mismas (con la película) contra el medio de calentamiento. En la técnica anterior ya se conocen manipuladores de placas de reacción y medios de calentamiento adecuados, por ejemplo, manipuladores robóticos, placas calientes y baños de agua.

30 El aparato puede comprender también medios sensores para inspeccionar el contenido de las aberturas durante o después de que se haya efectuado la reacción, tales como medios que usen fluorescencia, reflectancia o similares. Los medios sensores pueden ver dentro de las aberturas, por ejemplo en la PCR, a través de la película.

35 La aplicación del actual estado de la tecnología a una miniaturización de 1536 (o más) pocillos, con un volumen de reacción de 1 microlitro (o menos), es inadecuada debido a una combinación de diseño de pocillo e intolerancia de la muestra. Para crear una relación óptima entre volumen y espacio de aire, la placa miniaturizada requiere un perfil poco profundo, según se muestra en la Fig. 10b. Esto es contrario a la actual tecnología de placa adecuada para PCR (mostrada en la Figura 10a). El uso de este perfil de placa más bajo hace que el uso de las técnicas de sellado térmico convencionales sea inadecuado debido a la proximidad de la muestra al elemento de calentamiento, que resultaría en una "ebullición" de la muestra. Esto llevaría a un mal sellado y a fallos de reacción por evaporación de la muestra o daños en la muestra. El uso de soldadura láser evita este problema puesto que el efecto de calentamiento está localizado con precisión.

45 A continuación, se describirá la presente invención a título de ejemplo con referencia a los dibujos adjuntos, en los cuales:

50 Las Figuras 1 y 2 son vistas en planta de dos placas de reacción de acuerdo con la presente divulgación.

La Figura 3 es una vista en planta de una variante de formación de aberturas de acuerdo con la presente divulgación.

55 La Figura 4 es la sección A-A de la Figura 3.

La Figura 5 es una vista esquemática de un láser de diodo soldando una película sobre una placa dotada de aberturas de acuerdo con la presente invención.

60 La Figura 6 es una sección esquemática de una placa de reacción rellena y sellada de la presente divulgación.

La Figura 7 muestra una placa de reacción de la técnica anterior que podría usarse con el aparato de la presente divulgación.

65 La Figura 8 muestra una sección transversal parcial a través de una placa dotada de aberturas que tiene pocillos cilíndricos.

La Figura 9 muestra una sección transversal parcial a través de una placa dotada de aberturas que tiene pocillos cónicos; y

5 La Figura 10 muestra una comparación entre las respectivas relaciones entre volumen de pocillo y de muestra para un pocillo de la técnica anterior y un pocillo de placa de reacción soldada con láser.

Con referencia a las Figuras 1 y 2, se muestran dos diferentes placas de reacción 10 de acuerdo con la presente divulgación.

10 Las placas de reacción 10 comprenden una placa 12, dotada de aberturas, de forma sustancialmente rectangular que tiene unas dimensiones típicas de aproximadamente 85 por 125 mm, con un espesor de aproximadamente 2 mm. Extendiéndose a través de la placa dotada de aberturas 12 se proporciona una matriz de aberturas 14 que forman contenedores o pocillos para la placa de reacción 10. Cada abertura 14 es cilíndrica, con un diámetro de aproximadamente 1,8 mm. La matriz tiene una disposición de 32 por 48. Las aberturas también podrían ser
15 cuadradas o rectangulares, por ejemplo. Algunas aberturas, sin embargo, aparecen omitidas, o en blanco, según se explica más adelante. Están remplazadas por puntos de moldeo por inyección. No obstante, se podría moldear la placa dotada de aberturas con una matriz de aberturas completa, o formar una matriz completa en una pieza en bruto mediante taladrado u otros métodos de procesamiento.

20 En cualquier momento de la fabricación o del uso puede colocarse sobre la placa dotada de aberturas un código de barras o medio de identificación único (no representado).

En la Figura 1, las aberturas omitidas 16 están oscurecidas. En la Figura 2 aparecen como espacios en blanco.

25 Una esquina 18 de la placa de reacción 10 está achaflanada para proporcionar un medio de indexación para el aparato de procesamiento automatizado de placas de reacción de la presente divulgación.

30 Con referencia a las Figuras 3 y 4, se muestra una representación esquemática de una forma alternativa de placa de reacción 10. Se proveen dos aberturas 14 en la placa dotada de aberturas 12. Se proveen unas ranuras 20 que se extienden hasta el borde de cada abertura 14. Las ranuras 20 (o canales) permiten que unas aberturas 14 seleccionadas estén en comunicación de fluidos entre sí. Al estar las aberturas en comunicación de fluidos, se pueden transferir (flecha 21) fluidos (reactivos, por ejemplo) hasta unas aberturas que de otro modo estarían cerradas.

35 En uso, la ranura 20 estará cerrada, así como las aberturas 14. Una película 22 está unida a la placa dotada de aberturas 12 por encima de la ranura 20, según se muestra por la flecha 24 en la Figura 4. La película 22 será normalmente continua (véanse las Figuras 5 y 6), extendiéndose por encima de la totalidad de la placa dotada de aberturas 12, cerrando a la vez todas las aberturas 14 y cualquier ranura 20.

40 La ranura puede haber sido moldeada en la placa dotada de aberturas 12, o podría haber sido recortada en la placa dotada de aberturas 12.

45 Con referencia a la Figura 5, se muestra una representación esquemática de un dispositivo para unir una película 22 a una placa dotada de aberturas 12. El dispositivo comprende un aparato 26 de soldadura láser por diodo que tiene una unidad generadora láser 28 y un medio 30 de enfoque del rayo. En la técnica se conocen unidades de soldadura láser que serían adecuadas para esta aplicación, como es el láser por diodo Herfurth Láser Technology TL250. Estas unidades de soldadura de la técnica anterior realizan lo que se conoce genéricamente como "soldadura por transmisión".

50 Una placa dotada de aberturas 12 y una película 22 asociada son dispuestas de tal modo que la película 22 cubra las aberturas 14 requeridas. En este ejemplo son todas las aberturas 14. Entonces se dirige un láser 32 hacia la película 22 para soldar por puntos la película 22 a la placa dotada de aberturas 12 (en el punto mostrado por la flecha 34 en la Figura 5).

55 Después se mueve la película 22 y la placa dotada de aberturas 12, con respecto al láser 32, para permitir que se complete la soldadura. Preferentemente la soldadura se efectúa sobre todas las secciones de la película 22 que estén superpuestas sobre las porciones no dotadas de aberturas de la placa dotada de aberturas 12.

60 Mediante este método de fabricación se proporciona una placa de reacción plana, de pocillos múltiples, con unos agujeros pasantes que se cubren (cierran) por un extremo de los mismos con una película delgada, por ejemplo polipropileno, soldándose por láser la película a los mismos para crear una capa base. Entonces puede introducirse en los pocillos una muestra o material 36 (véase la Figura 6) a través del extremo abierto de los pocillos y sellar los mismos sujetando una lámina superior a la placa para cerrar el extremo abierto de los pocillos. La muestra o material 36 suele ser una muestra y uno o más reactivos.

65 Un sello formado por el proceso de soldadura láser será tanto más eficiente cuanto mejor sea el contacto entre las

dos superficies a soldar. Preferentemente, la película y la placa a soldar serán mantenidos juntos, por aplicación de presión usando materiales no absorbentes de láser, permitiendo que la soldadura láser tenga lugar a través de los materiales. Dicho material es preferentemente vidrio, Perspex (RTM) o, más preferentemente, una combinación de caucho de silicona y/o vidrio. Alternativamente puede ser una presión de aire aplicada desde arriba o una presión de vacío desde debajo de la placa.

El aparato anteriormente descrito proporciona placas de reacción con una densa matriz de pocillos o contenedores que son pequeños y llevan selladas en los mismos unas muestras individualmente tratables, permitiendo así PCR con bajos volúmenes de líquidos de muestra, por ejemplo, y con un gran número de ensayos en los mismos. Adicionalmente, la soldadura láser es extremadamente precisa y el calor queda localmente contenido en el blanco. Por lo tanto, pueden soldarse películas muy delgadas. Puesto que se usa una película, el calentamiento de la muestra puede ser controlado con precisión cuando el calentamiento es por medio de transferencia de calor a través de la película. A título de ejemplo, la película 22 tendrá generalmente un espesor igual o inferior a 120 micrómetros. Preferentemente la película tiene 62 micrómetros de espesor.

En una realización preferida, el láser de diodo se utiliza para fundir el adhesivo de películas recubiertas de adhesivo para conectar esas películas a la placa dotada de aberturas 12. El láser de diodo también puede utilizarse para fundir de nuevo el adhesivo para retirar la película para acceder al material 36 (véase la Figura 6) que había sido sellado dentro de los pocillos. Esto proporciona reciclabilidad. No obstante, el adhesivo deberá ser elegido de manera que no contamine el material 36 dentro del pocillo.

Aunque en el presente documento se han ilustrado matrices específicas de pocillos múltiples (1440 pocillos y 1152 pocillos en las Figuras 1 y 2, respectivamente), la presente divulgación puede ser utilizada para crear recipientes de almacenamiento de líquido con formatos existentes, por ejemplo con 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 96 o 384 pocillos, o incluso con 1536, 3456 o 6144 pocillos o cualquier otra de tales variantes a voluntad. También pueden proporcionarse matrices que tengan otras disposiciones de aberturas en blanco.

Un ejemplo de matriz de una abertura sería para el procesamiento de micromatrices de ADN/Oligonucleótidos sobre portaobjetos de vidrio o plástico. Podría soldarse al portaobjetos un delgado marco de 1 mm de espesor, después se soldaría una película al marco, cubriendo la totalidad de la superficie. Podrían proporcionarse bocas de entrada y salida de fluidos para permitir el paso de fluidos por encima del portaobjetos o de la muestra de una manera controlada.

Las placas dotadas de aberturas preferidas son moldeadas por inyección completas y con las aberturas. Sin embargo, debido a la fina naturaleza del tamaño de aberturas preferido, puede ser necesario usar múltiples puntos de inyección para la etapa de moldeo por inyección. Usando múltiples puntos de inyección no hay dificultad para asegurar que el material inyectado, es decir, el plástico, fluya totalmente por dentro del molde. En la placa de la Figura 2, la máxima distancia del flujo de inyección dentro del molde puede ser tan pequeña como 2 o 3 mm (cada abertura en blanco corresponde a un punto de moldeo por inyección). Colocando estos regularmente sobre la placa dotada de aberturas, puede conseguirse una inyección uniforme. No obstante, sería posible moldear por inyección la placa dotada de aberturas con menos puntos de moldeo por inyección. Para la placa dotada de aberturas de la Figura 1 se usaron 96 puntos de moldeo por inyección. En la placa dotada de aberturas de la Figura 2 fueron 384 puntos de moldeo por inyección.

Este método de fabricación de placas de reacción 10, y las propias placas de reacción, tienen diversos usos. Estos incluyen:

1. La soldadura de una película de polímero, transparente y translúcida, a una placa de reacción de plástico, con múltiples pocillos, crea un sello estanco a los líquidos. Si también se cierra el otro extremo de los pocillos, se forma una contención estanca a los líquidos, o incluso estanca a los fluidos. También puede conseguirse esta contención soldando unas películas tanto de techo como de base a los extremos de un tubo cilíndrico o cuadrado, o una tubería, y pueden crearse, por ejemplo, matrices tipo placa múltiple bidimensional y marcos de portaobjetos de vidrio/plástico o tiras de recipientes unidimensionales, y formar con ellos matrices mayores.

2. En la fabricación de micropocillos para efectuar una amplificación de ADN (reacción en cadena de la polimerasa) que deba llevarse a cabo con bajos volúmenes (menos de 4 microlitros).

3. En la fabricación de sellos estancos a los líquidos sobre microcanales para transferir o añadir líquidos desde cada pocillo, creando así un "laboratorio en una placa o chip".

4. La soldadura láser de películas de polipropileno, tratadas y pre-recubiertas (estrepavidina, ADNs, oligonucleótidos, tintes de color, etc.) a placas dotadas de aberturas para crear placas de reacción en formato de microtitulación con superficies internas pre-recubiertas.

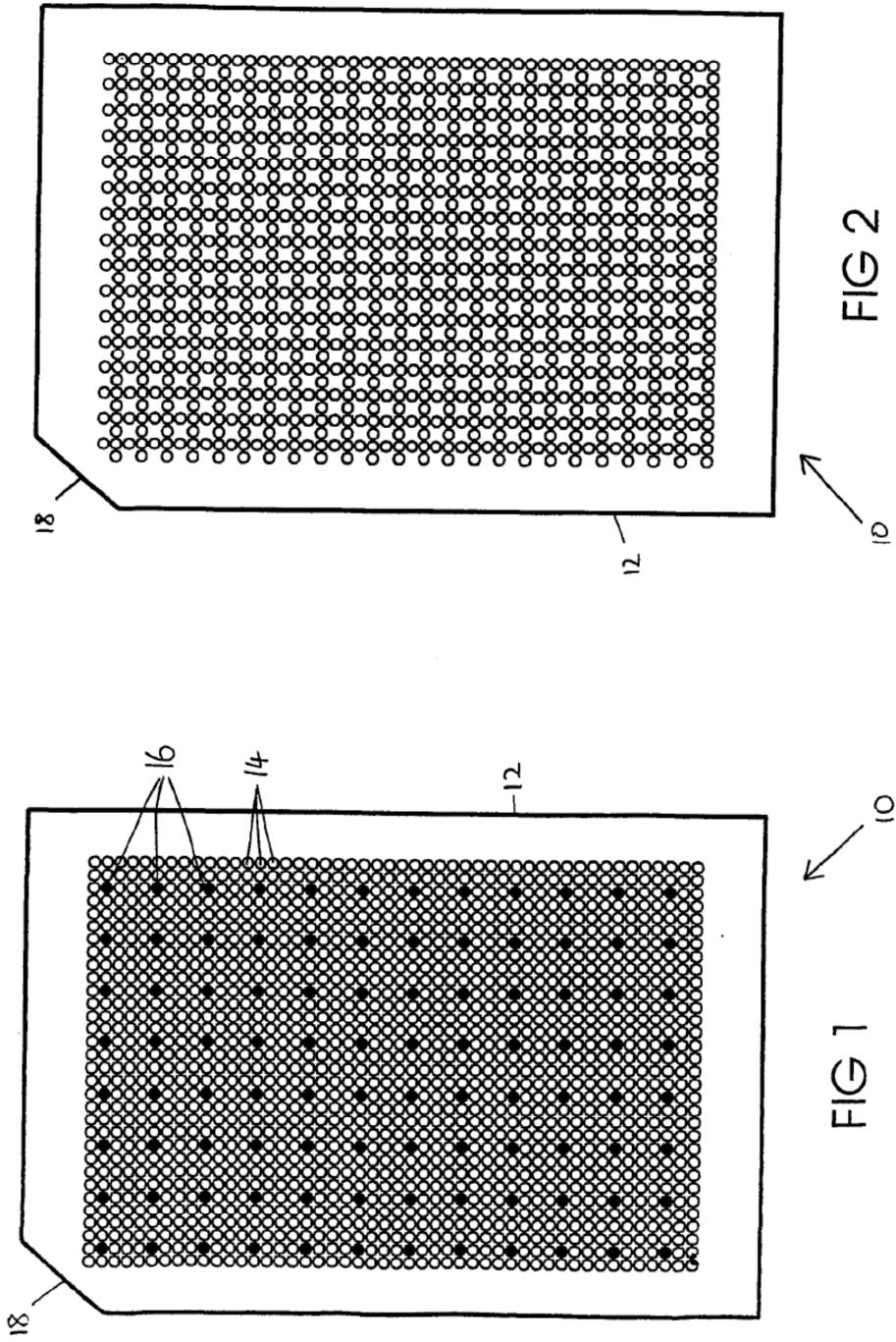
5. El uso de placas de reacción soldadas con láser para formación de imágenes fluorescentes simples o multiplexadas, por ejemplo para aplicaciones de genotipificación y normalmente aplicaciones de TaqMan® por

Applied Biosystems.

- 5 6. El uso de placas de reacción soldadas con láser para formación de imágenes fluorescentes simples o multiplexadas, por ejemplo para aplicaciones de genotipificación y normalmente ensayos basados en Transferencia de Energía de Resonancia Fluorescente (FRET).
- 10 7. Para aplicaciones de genotipificación en las que los blancos específicos (simples y multiplexados) de la detección de análisis SNP (Polimórfico de Nucleótido Único) de señal positiva son observados en la placa de reacción desde lo alto o desde la base o, retirando el reactivo/muestra, por medio de espectroscopia, secuenciación basada en gel ("slab" (plano) y capilar), radiación, fluorescencia, quimioluminiscencia o hibridación.
- 15 8. Para la detección de ADN, proteínas, anticuerpos, fluidos biológicos, sueros, orina por etiquetas.
- 15 9. Para el uso en genotipificación de pacientes/población, monitorización medioambiental, ensayos de guerra NBC (nuclear, biológica y química), control de calidad usando el nuevo formato de placa con marcas/sondas precalibradas en forma de "kit".
- 20 10. El pegado a una sola o a ambas superficies de un material o una película conductivos que tengan propiedades de "detección" (conducción/reacción) o que faciliten el movimiento (es decir, el flujo osmótico) o el control de los reactivos/fluidos en los mismos.
- 25 11. Para la creación de muestras o sondas secas de ADN u Oligonucleótidos para su distribución.
- 25 Podría usarse una unidad de matriz de láseres de diodo para aumentar la velocidad a la que se completa la soldadura; en lugar de soldar un punto o una línea, puede soldarse así una tira. La matriz de láseres de diodo puede ser, por ejemplo, una matriz unidimensional de láseres de diodo con diversas configuraciones, es decir, circular, cuadrada, rectangular o en línea. El láser de diodo puede tener un foco variable que permita diversos tamaños diferentes de "puntos" láser.
- 30 La unidad de láser o de matriz de láseres puede ser montada en una plataforma robótica para controlarla, de tal modo que pueda cubrirse la placa con una hoja de polipropileno para crear contención o contenedores, o soldar cada cierre de pocillo individual. Esto se consigue, por ejemplo, desplazando el láser por encima del espacio intersticial entre las aberturas de pocillo, protegiendo así las muestras de una exposición a la fuente de láser.
- 35 Mediante el uso de láseres de diodo, por ejemplo en formato de matriz, es ahora posible soldar, por ejemplo, una película de polipropileno a un sustrato sólido, absorbente de láser, para crear una placa de microtitulación o reacción, rígida, térmicamente eficiente y estable, capaz de llevar a cabo un mayor número de PCRs/reacciones de una tirada, y con volúmenes significativamente menores que los conseguidos anteriormente usando las placas de reacción de pocillos múltiples, moldeadas convencionalmente, o la desventajosa placa de reacción sellada con adhesivo, ya que la soldadura térmica convencional de una película daba malos resultados ópticos debido a que la capa de cola reducía la eficiencia óptica.
- 40 La matriz unidimensional de láseres de diodo suelda con precisión, rápida y eficazmente en el punto de contacto de los dos materiales, es decir, el sustrato absorbente de láser y el material no absorbente de láser (es decir, la película/hoja adecuadamente transparente).
- 45 El ADN y los reactivos comunes no son muy absorbentes de energía "IR" (infrarroja) y por lo tanto no son muy susceptibles a daños por calentamiento en el momento de la soldadura. Además, el láser está desenfocado por debajo de la capa de soldadura, reduciendo sustancialmente cualquier energía láser.
- 50

REIVINDICACIONES

1. Un método para formar sellos alrededor de una pluralidad de pocillos de una placa de reacción, estando definidos los pocillos por una pluralidad de aberturas (14,20) en una superficie plana de la placa de reacción (10,12) dotada de aberturas y conteniendo un reactivo de PCR, comprendiendo el método la etapa de unir una película de plástico (22) a la superficie plana de la placa de reacción dotada de aberturas para sellar el reactivo dentro de los pocillos, usando soldadura láser de diodo de infrarrojo cercano para formar los sellos, en donde la placa de reacción dotada de aberturas tiene al menos 1536 pocillos.
2. El método de la reivindicación 1, en el que la película (22) cubre todas las aberturas (14,20), extendiéndose sobre la totalidad de la superficie plana de la placa de reacción dotada de aberturas (12).
3. El método de las reivindicaciones 1 o 2, en el que cada abertura (14,20) se extiende desde una primera superficie plana de la placa de reacción dotada de aberturas hasta una segunda superficie plana, opuesta, opcionalmente en donde se suelda una segunda película a la segunda superficie, opcionalmente en donde ambas películas son soldadas a la placa de reacción dotada de aberturas por diodos de infrarrojo cercano.
4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que se proporcionan unos canales o ranuras (20), en particular ranuras o micropistas superficiales, en la placa de reacción dotada de aberturas.
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la película (22) es ópticamente transparente con interferencia mínima.
6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la película (22) tiene un espesor de entre 1 y 500 micrómetros.
7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la placa tiene menos de 4 mm de espesor, opcionalmente aproximadamente 0,2 mm de espesor, aproximadamente 0,5 mm de espesor, aproximadamente 1,3 mm de espesor, aproximadamente 2 mm de espesor o aproximadamente 3 mm de espesor.
8. El método de la reivindicación 7, en el que la placa de reacción se forma o se corta a partir de una banda continua o un rollo de material dotado de aberturas.
9. El método de las reivindicaciones 1-7, en el que la placa de reacción dotada de aberturas (12) es sustancialmente rígida y opaca.
10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la placa de reacción dotada de aberturas (12) es absorbente de infrarrojo cercano, en el que opcionalmente la placa de reacción dotada de aberturas (12) es negra.
11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la placa de reacción dotada de aberturas (12) no es absorbente de infrarrojo cercano.
12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la película (22) es absorbente de infrarrojo cercano.
13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la película (22) es fácilmente perforable.
14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la película (22) está recubierta de un reactivo de afinidad, en el que opcionalmente el reactivo de afinidad es estreptavidina.
15. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la película (22) está recubierta de un producto químico usado en una reacción para la cual se usará la placa de reacción.
16. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las aberturas tienen un diámetro de 1,8 mm, o en el que la separación entre los centros de las aberturas es de 2,25 mm.
17. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que los pocillos contienen uno o más reactivos de PCR y una o más muestras.



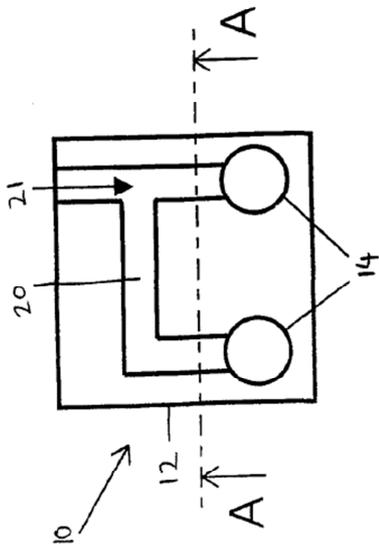


FIG 3

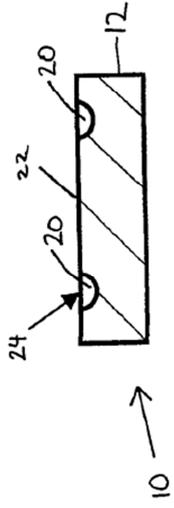


FIG 4

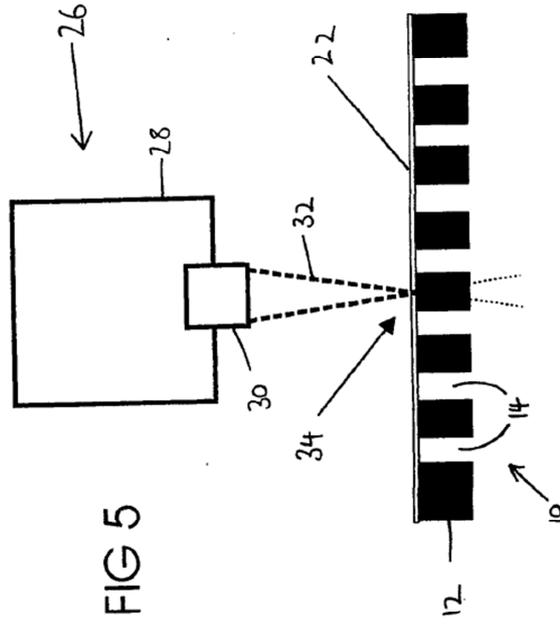


FIG 5

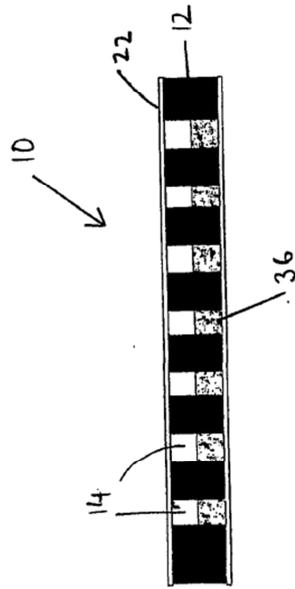


FIG 6

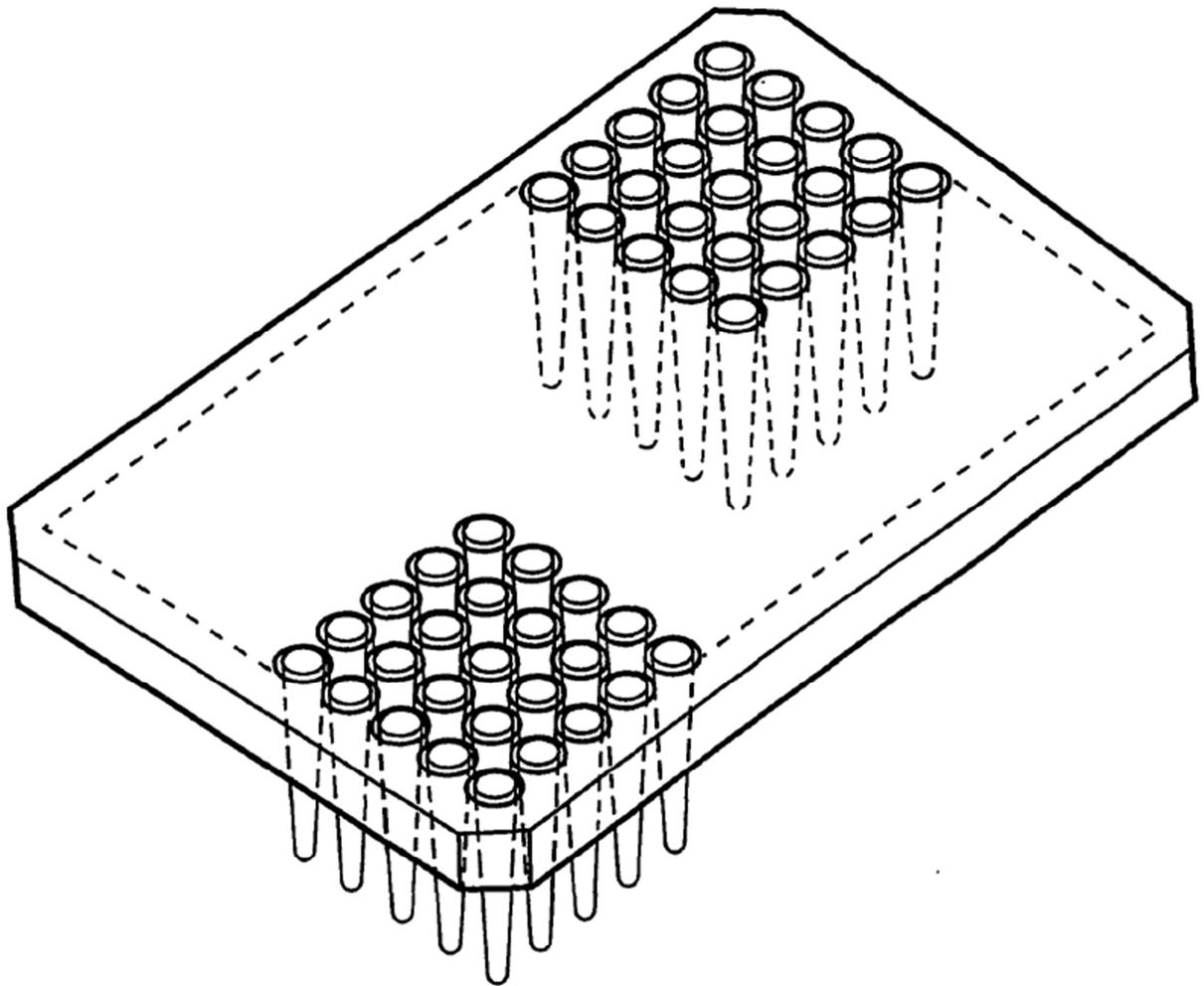


FIG 7
(TÉCNICA ANTERIOR)

Fig. 8

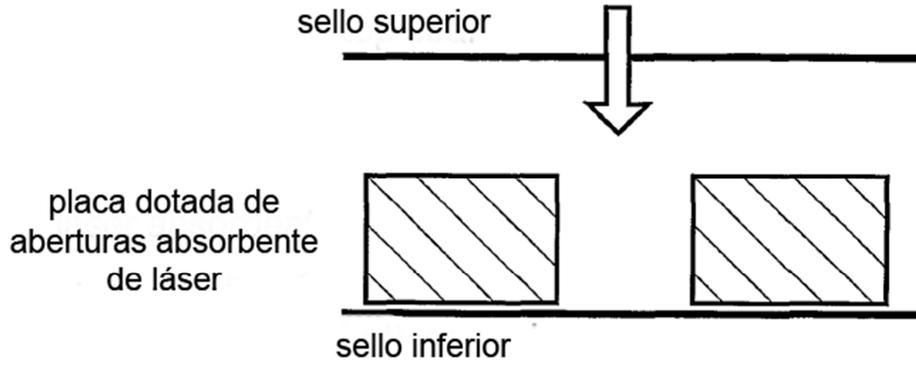


Fig. 9

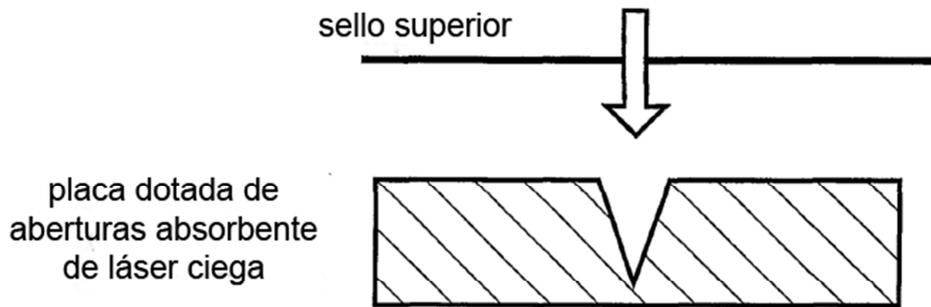


Fig. 10

