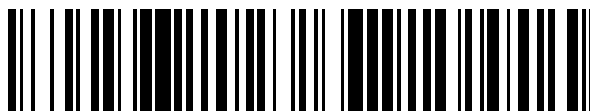


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 661 768**

51 Int. Cl.:

G01N 21/64 (2006.01)
C12N 15/00 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)
G02B 21/06 (2006.01)
G02B 27/09 (2006.01)
G01N 1/30 (2006.01)
G01N 33/58 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.10.2009 PCT/DK2009/050278**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **29.04.2010 WO10045949**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.10.2009 E 09744320 (4)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.01.2018 EP 2350617**

54 Título: **Aparato y procedimiento de imagenología por fluorescencia**

30 Prioridad:

21.10.2008 DK 200801464

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

03.04.2018

73 Titular/es:

**CHEMOMETEC A/S (100.0%)
 Gydevang 43
 3450 Allerød, DK**

72 Inventor/es:

**KJÆRULFF, SØREN;
 SKINDERSØ, METTE ELENA;
 SØRENSEN, HELLE FROBØSE;
 RAVN, FRANS y
 GLENSBJERG, MARTIN**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 661 768 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

Aparato y procedimiento de imagenología por fluorescencia

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un analizador de partículas. Más particularmente, la invención se refiere a un procedimiento y un aparato para análisis de partículas, tales como partículas biológicas.

10 Antecedentes de la invención

Muchas técnicas modernas de bioquímica y biotecnología se basan en el análisis de partículas biológicas, por ejemplo, células. Varios parámetros relativos al tipo o especie de las partículas, así como el estado de las partículas, tales como viabilidad, están entre parámetros y propiedades que se investigan de forma rutinaria. Información adicional sobre el estado intercelular también se determina frecuentemente. En este campo, el procedimiento de detección de luminiscencia, por ejemplo detección de fluorescencia, ha conseguido una aplicación amplia, principalmente debido a su especificidad y sensibilidad inherentes.

El documento EP 1 316 793 A describe un aparato para caracterizar una colección de células, por ejemplo, con respecto a su viabilidad, usando un dispositivo de imagenología con una resolución efectiva de 752x576 píxeles para obtener una imagen refractaria más una imagen de campo claro y/o una imagen de fluorescencia de la colección de células.

El documento US 2003/103662 A divulga un sistema de microscopio robótico para análisis de alto rendimiento de materiales biológicos, en particular células vivas, basándose en imágenes de fluorescencia y de contraste de fases. El sistema está configurado para permitir el retorno preciso a y la formación de nuevo de imágenes del mismo campo (por ejemplo, la misma célula) de la que se ha formado una imagen antes. Esto permite observar cambios en la muestra a lo largo del tiempo.

El análisis fotoluminiscente de material, tal como material biológico, se basa en la iluminación de una muestra con luz (excitación) de una longitud de onda dada y recoger luz emitida (emisión) desde la muestra, partes o componentes de la muestra, a otra longitud de onda sustancialmente diferente. La diferencia de longitud de onda entre excitación y emisión (denominada generalmente desplazamiento de Stokes) es una propiedad de la muestra que está siendo analizada, más generalmente una propiedad de las moléculas fotoluminiscentes presentes en la muestra. Si el desplazamiento de Stokes es lo suficientemente grande para permitir la separación óptica sustancial de luz de excitación y de emisión, es viable usar el procedimiento de fotoluminiscencia para el análisis del material.

La emisión fotoluminiscente (por ejemplo fosforescencia o fluorescencia) es normalmente de baja intensidad en comparación con la luz de excitación, habitualmente del orden de varias magnitudes. El hecho de que la emisión se detecte contra "oscuridad", hace al procedimiento muy adecuado, dado que muchos de los detectores disponibles en el mercado muestran baja respuesta a la "oscuridad" mientras que responden considerablemente bien a la luz, por ejemplo fotones, que impacta con el detector. No obstante la sensibilidad mejorada, por ejemplo expresada como emisión aumentada, es normalmente una propiedad favorable y, por lo tanto, existen actualmente numerosos procedimientos para ese fin en la técnica anterior.

El aumento de la intensidad de la luz de excitación generalmente aumenta la cantidad de luz emitida, dado que la probabilidad de generar emisión es proporcional al número de fotones que interactúan con moléculas fotoluminiscentes. Un procedimiento usado a menudo para el aumento de la intensidad de excitación es el uso de láser, que están disponibles en configuraciones donde la cantidad de luz emitida es grande, tanto dado que la cantidad de luz emitida, por ejemplo expresada como flujo de energía, es considerable, pero también dado que la luz proveniente de un láser es fácilmente enfocada sobre un área pequeña, generando de este modo densidad lumínica elevada, por ejemplo expresada como energía emitida por área.

Otro procedimiento para la iluminación de material fotoluminiscente es usar una fuente de luz dispersada, tal como una lámpara o un diodo emisor de luz. La ventaja de dichas fuentes de luz es que emiten luz dispersada, permitiendo de este modo la iluminación de un área considerablemente grande. Una desventaja común de estas fuentes de luz ha sido normalmente el grado relativamente malo de iluminación homogénea del material de muestra, obtenida simultáneamente con un alto grado de eficacia, definido por la fracción de luz emitida que golpea el material de muestra.

60

El equipo a menudo preferido para análisis biológicos es un microscopio, normalmente equipado con dos o más objetivos para aumentos variables. Además, la detección de fluorescencia requiere filtros de excitación y de emisión de longitud de onda específica. El funcionamiento de un microscopio se ha automatizado hasta cierto punto, principalmente a través de la implementación del análisis de imágenes. Sin embargo, incluso con dicha automatización, el funcionamiento de un microscopio es principalmente una tarea manual, que requiere una formación considerable del operador.

Los citómetros de flujo automatizados también se usan para analizar partículas tales como células. El citómetro de flujo es sinónimo de una amplia gama de equipos caracterizados por el análisis de partículas en condiciones de flujo, donde estas condiciones generalmente permiten analizar partículas individuales una cada vez. El citómetro de flujo en ciertas versiones hace que los análisis complejos de partículas biológicas estén disponibles, pero los citómetros de flujo son difíciles de usar porque el manejo generalmente requiere una habilidad considerable por parte del operador.

El aparato y procedimiento de la presente divulgación también aborda las áreas de viabilidad celular. La determinación de la viabilidad celular es importante para valorar los efectos de, por ejemplo, fármacos, contaminantes ambientales, temperatura, extremos iónicos y radiación sobre células y tejidos. La integridad de la membrana celular se usa comúnmente como indicador de la viabilidad celular. Una característica de la pérdida de integridad de la membrana es la formación de poros que permiten el paso de moléculas de bajo peso molecular (MW < 2000 Daltons) dentro y fuera de la célula. La permeabilidad mejorada ha sido la base para muchos ensayos de viabilidad celular. Los procedimientos más comunes usados para las mediciones de viabilidad son la liberación de ⁵¹Cr, la exclusión con azul tripán y la combinación de diferentes colorantes fluorescentes para detectar células vivas y muertas. La patente de los Estados Unidos N.º 6.403.378 describe un procedimiento basado en la integridad de la membrana que utiliza dos colorantes fluorescentes, uno que etiqueta todas las células muertas con membranas comprometidas, mientras que el otro etiqueta todas las células vivas. Para obtener resultados fiables para diferentes poblaciones y densidades de células usando un procedimiento con dos colorantes, es crucial controlar cuidadosamente la cantidad de cada colorante y el tiempo de incubación usado para teñir las células. El yoduro de propidio y el bromuro de etidio se excluyen del citosol y, por lo tanto, del núcleo, de las células viables y se mencionan como los rastreadores fluorescentes más comunes para teñir las células muertas. Por el contrario, la naranja de acridina y Hoechst-33342 son captados fácilmente por células viables y se usan a menudo como sondas fluorescentes para teñir células vivas.

La naranja de acridina (nombre de la IUPAC: N,N,N',N'-tetrametilacridin-3,6-diamina, sinónimos: Basic Orange 3RN, Eucrisina, naranja de acridina NO, naranja de rodulina NO, naranja de waxolina, etc.) es un colorante catiónico fluorescente selectivo de ácido nucleico que interactúa con ADN y ARN por intercalación o atracciones electrostáticas. Cuando se une a ADN y ARN bicatenario, la naranja de acridina tiene un máximo de excitación a 502 nm y un máximo de emisión a 525 nm. Cuando se asocia con ácido nucleico monocatenario, el máximo de excitación se desplaza a 460 nm y el máximo de emisión se desplaza a 650 nm. También se sabe que la naranja de acridina muestra alteraciones de las propiedades de absorción y fluorescencia en sus diferentes formas. El colorante monomérico en solución exhibe una fluorescencia verde, mientras que el apilamiento de naranja de acridina en estructuras oligoméricas tendrá una emisión roja (*Kapuscinski y col., 1982: Luminescence of the solid complexes of acridine orange with RNA. Cytometry 2, págs. 201-211*). Esta alteración resulta de un aumento dependiente de la concentración de la transferencia de energía de resonancia entre las moléculas individuales de naranja de acridina, y las concentraciones crecientes de naranja de acridina en una solución inducirán la extinción progresiva de la emisión verde (*Millot y col., 1997: Characterization of Acidic Vesicles in Multidrug-resistant and Sensitive Cancer Cells by Acridine Orange Staining and Confocal Microspectrofluorometry. The Journal of Histochemistry & Cytochemistry 45(9): págs. 1255-1264*). La naranja de acridina también entrará en compartimentos ácidos tales como los lisosomas y se protonará y será secuestrada. En estas condiciones de pH bajo, el colorante emitirá luz roja cuando sea excitado por luz azul. En conclusión, esto muestra que el espectro de emisión de fluorescencia de la naranja de acridina se ve afectado por muchos factores, incluyendo la estructura secundaria grosera de los polinucleótidos, el pH y la concentración de naranja de acridina.

El DAPI o 4',6-diamidino-2-fenilindol es otro colorante fluorescente que ha sido descrito como capaz de penetrar las células y útil para la tinción de células vivas (por ejemplo, *Betty I. Tarnowski; Francis G. Spinale; James H. Nicholson. 1991. Biotechnic and Histochemistry, 66: 296 - 302*). Sin embargo, estudios minuciosos en nuestros laboratorios han revelado que el DAPI penetra en las células con una cinética bastante lenta. De este modo, controlando la concentración y el tiempo de incubación, puede usarse DAPI como una sonda para teñir células no viables y, por lo tanto, puede usarse para discriminar entre células vivas y muertas. El DAPI se une preferentemente al ADN bicatenario y se asocia con agrupaciones de AT en el surco menor. Cuando se une al ADN bicatenario, su máximo de absorción es a 358 nm y su emisión máxima está a 461 nm. La unión de DAPI a ADN produce una

potenciación de la fluorescencia de 20 veces. El DAPI también se asociará al ARN, aunque en un modo de unión diferente. El pico de emisión del complejo DAPI/ARN se desplaza hacia el rojo a aproximadamente 500 nm y el rendimiento cuántico es solo el 20% de aquel del complejo DAPI/ADN.

- 5 La combinación de naranja de acridina y DAPI no se ha sugerido previamente como tal o ha demostrado ser adecuada para un ensayo de fluorescencia simultánea o de dos colores de la viabilidad celular.

El aparato y procedimiento de la presente divulgación también aborda las áreas de transfección. La transfección, la introducción de ácido nucleico extraño (ADN o ARN) en una célula eucariota, es un procedimiento de laboratorio común e importante para estudiar la función de los genes y las proteínas en las células vivas. Existen numerosos procedimientos disponibles para la transfección celular, tales como la formación de complejos del ácido nucleico con DEAE dextrano o fosfato de calcio para permitir la captación celular por endocitosis, o electroporación, que emplea pulsos de voltaje para formar poros en la membrana plasmática a través de los cuales el núcleo el ácido puede entrar. La mayoría de los procedimientos de transfección, sin embargo, implican complejos de ácidos nucleicos y lípidos catiónicos seguidos de fusión con células y administración de ADN/ARN al interior del citosol. Aunque es bastante rutinaria, la transfección requiere la optimización de las condiciones de ensayo para diferentes tipos celulares. Existen diversos procedimientos para determinar la eficacia de la transfección en poblaciones celulares. La mayoría de estos monitorizan la expresión de un gen reportero fluorescente, luminiscente o colorimétrico. El gen reportero puede estar presente en el mismo vector que el gen de interés o en un vector independiente. Los genes reporteros convenientes para medir la eficacia de la transfección son las proteínas autofluorescentes, por ejemplo, la proteína verde fluorescente (GFP) aislada de la medusa *Aequorea victoria* y la proteína roja fluorescente (RFP) desarrollada a partir de la anémona marina *Discosoma striata*, que permiten ensayos en células vivas y no requiere sustrato para la generación de fluorescencia. Cuando se excita con luz azul, la GFP emite luz verde, mientras que la RFP emite luz naranja/roja cuando se excita con luz verde. Además, la combinación de GFP con colorantes apropiados permite el análisis múltiple para estimar, por ejemplo, la viabilidad, la citotoxicidad y la apoptosis.

Otro enfoque para monitorizar la eficacia de la transfección emplea ácidos nucleicos etiquetados fluorescentemente como reportero, por ejemplo, siRNA etiquetado con Cy5 para optimizar los experimentos de silenciamiento de ARNi.

30 En un procedimiento de análisis, las células transfectadas con GFP se incuban con DACM y yoduro de propidio (PI). El DACM reacciona con tioles, cuyo nivel es bajo en células moribundas/muertas, para producir un producto fluorescente azul en las células vivas. Por el contrario, el PI sólo penetra en las células con membranas dañadas y, por lo tanto, sólo etiqueta el ADN de las células muertas. Las células etiquetadas con DACM se detectan mediante excitación UV/violeta y midiendo la luz azul, mientras que las células etiquetadas con PI se detectan mediante excitación con luz verde y midiendo la luz roja emitida. Las células que expresan GFP (células transfectadas) se monitorizan mediante excitación con luz azul y medición de luz verde. La información sobre la eficacia de la transfección y, por ejemplo, la viabilidad se puede extraer de los datos.

En otro procedimiento de análisis, las células transfectadas RFP se incuban con DACM y homodímero de acridina. El homodímero de acridina sólo penetra en las células con membranas dañadas y, por lo tanto, sólo etiqueta las células muertas. Las células vivas etiquetadas con DACM se detectan mediante excitación UV/violeta y midiendo la luz azul, mientras que las células muertas etiquetadas con homodímero de acridina se detectan mediante excitación con luz azul y midiendo la luz verde emitida. Las células que expresan RFP (células transfectadas) se monitorizan mediante excitación con luz verde y midiendo la luz roja. La información sobre la eficacia de la transfección y, por ejemplo, la viabilidad se puede obtener a partir de los datos.

En un tercer procedimiento de análisis, las células transfectadas con siRNA, etiquetadas con un fluoróforo verde, por ejemplo FITC, se incuban con DACM y PI. Las células vivas etiquetadas con DACM se detectan mediante excitación con UV/violeta y midiendo la luz azul, mientras que las células muertas etiquetadas con PI se detectan mediante excitación con luz verde y midiendo la luz roja emitida. Las células que albergan siRNA (células transfectadas) se monitorizan mediante excitación con luz azul y midiendo la luz verde. La información sobre la eficacia de la transfección y, por ejemplo, la viabilidad se puede extraer de los datos.

No se ha sugerido o demostrado previamente que la combinación de un reactivo que reacciona con tiol y un tinte de ADN incapaz de penetrar en las células en una población de células transfectadas con ácido nucleico es adecuada para un ensayo simultáneo de eficacia de transfección, viabilidad celular y citotoxicidad.

El aparato y procedimiento de la divulgación también aborda el área del ciclo celular. El ciclo celular representa el proceso más fundamental e importante en las células eucariotas. Un conjunto ordenado de acontecimientos, que culmina en el crecimiento celular y la división en dos células hijas, el ciclo celular está estrictamente regulado por la

expresión, la localización y la destrucción temporales y espaciales definidas de varios reguladores del ciclo celular. Las ciclinas y las cinasas dependientes de ciclina (CDK) son conmutadores de control fundamentales para el ciclo celular, que hacen que la célula se mueva de las fases G₁ a S o de G₂ a M. En una población dada, las células se distribuirán entre tres fases fundamentales del ciclo celular: la fase G₁/G₀ (un conjunto de cromosomas emparejados por célula), fase S (síntesis de ADN con cantidad variable de ADN), y fase G/M (dos conjuntos de cromosomas emparejados 2 a 2 por célula, antes de la división celular).

El enfoque más común para determinar la fase del ciclo celular se basa en la medición del contenido de ADN celular. El contenido de ADN puede determinarse usando tintes selectivos de ADN fluorescentes que exhiben señales de emisión proporcionales a la masa de ADN. La fluorescencia celular se mide por citometría de flujo, imagen o escaneo con láser. Este análisis se realiza normalmente en células permeabilizadas o fijadas usando un tinte de ácido nucleico incapaz de penetrar en las células, pero también es posible usar células vivas y un tinte de ácido nucleico capaz de penetrar en las células.

Debido a que la desregulación del ciclo celular es un suceso tan común en las neoplasias, la oportunidad de descubrir nuevas dianas para los agentes anticáncer y la mejora de la terapéutica ha sido el foco de gran interés. El ensayo del ciclo celular tiene aplicabilidad en diversas áreas de investigación de ciencias de la vida y desarrollo de fármacos, incluida la biología del cáncer, análisis de apoptosis, cribado de fármacos y medición del estado de salud de cultivos celulares, por ejemplo en biorreactores.

El DAPI es un colorante competente para la medición de la fase del ciclo celular. Sin embargo, la excitación de DAPI requiere una fuente de luz UV y los citómetros de flujo estándar normalmente vienen sin una fuente de luz UV, lo que dificulta el uso de DAPI.

El aparato y procedimiento de la divulgación también aborda el área de la muerte celular. La muerte celular puede producirse mediante dos mecanismos distintos, necrosis o apoptosis. La necrosis se produce cuando las células están expuestas a un estrés físico o químico severo (por ejemplo, hipotermia, hipoxia) mientras que la apoptosis es un proceso bioquímico estrictamente controlado mediante el cual se eliminan las células y donde la célula participa activamente en su propia destrucción ("suicidio celular"). La apoptosis es uno de los tipos principales de muerte celular programada que se producen en organismos multicelulares y se caracteriza por una serie de acontecimientos que conducen a diversos cambios morfológicos, incluyendo formación de ampollas, fragmentación nuclear, condensación de cromatina, contracción celular, pérdida de asimetría de membrana y translocación del fosfolípido fosfatidilserina (PS) de la membrana desde el estrato interno al externo de la membrana plasmática.

La apoptosis es un proceso tanto muy complejo como muy importante y las desregulaciones en la maquinaria de apoptosis pueden causar enfermedades muy graves. Un creciente conjunto de indicios sugiere que la resistencia a la apoptosis es una característica de la mayoría, si no de todos los tipos de cáncer. Además, los defectos en la señalización de la apoptosis contribuyen a la resistencia a los fármacos de las células tumorales. Por otro lado, la hiperactividad de los procesos apoptóticos también puede causar enfermedades tales como las enfermedades neurodegenerativas como se observa en las enfermedades de Parkinson o Alzheimer, donde se cree que la apoptosis explica gran parte de la muerte celular y la pérdida progresiva de neuronas.

Como la apoptosis desempeña un papel muy importante en una amplia gama de procesos biológicos, incluyendo la embriogénesis, el envejecimiento y muchas enfermedades, este tipo de muerte celular programada es el tema de muchos estudios, y son deseables herramientas para la detección e investigación de la apoptosis.

Resumen de la invención

La invención se refiere a un aparato tal como se define en la reivindicación 1 y a un procedimiento tal como se define en la reivindicación 21. Realizaciones preferidas del aparato y el procedimiento se definen en las reivindicaciones dependientes.

Breve descripción de los dibujos

Las realizaciones de la invención, junto con sus ventajas, pueden entenderse de la mejor manera a partir de la siguiente descripción detallada tomada junto con las figuras adjuntas, en las que:

La figura 1 ilustra una fuente de luz para la iluminación de una muestra y un sistema de aparato de la técnica anterior para enfocar la luz de iluminación sobre el material de muestra;

La figura 2 ilustra un sistema para la iluminación de un material de muestra usando una agrupación ordenada de microlentes;

La figura 3 ilustra la comparación de dos procedimientos para la iluminación de material de muestra;

5

La figura 4 ilustra una implementación de acuerdo con la presente divulgación;

La figura 5 ilustra el tamaño de la región de iluminación de acuerdo con la presente divulgación;

10 La figura 6 ilustra un elemento de agrupación ordenada de microlentes de acuerdo con la presente divulgación;

La figura 7 ilustra en A) una disposición del aparato donde las unidades se disponen en, o sustancialmente en, el eje óptico de un sistema de imagenología fotoluminiscente, preferentemente en una disposición donde la luz de iluminación es dirigida directamente hacia una unidad detectora de un sistema de imagenología, y en B) una
15 disposición donde las unidades se disponen sustancialmente fuera del eje óptico de un sistema de imagenología fotoluminiscente, preferentemente en una disposición que incluye un espejo dicróico que refleja la luz de iluminación sobre la muestra a lo largo del eje de un sistema de imagenología;

La figura 8 ilustra en A) imágenes de cultivos de células Jurkat, HEK293, S2 y Sf9, compuestas por el aparato
20 (aumento de 2X). Cada panel muestra una imagen de las mismas células: izquierda; AO, derecha; DAPI; y B) ilustra imágenes de cultivos de células Jurkat, compuestas por el aparato (aumento 2X). Cada panel muestra una imagen de las mismas células: superior; AO, medio; DAPI, inferior; superposición de las dos imágenes;

La figura 9 ilustra microscopía fluorescente de células Jurkat teñidas con DAPI y microfotografiadas a 40 aumentos
25 usando un cubo de filtros de paso de banda UV. Cada panel muestra las siguientes imágenes de las mismas células: izquierda; contraste de fases, derecha; DAPI;

La figura 10 ilustra microscopía fluorescente de células Jurkat microfotografiadas a 20 aumentos. A) contraste de
30 fases. B) células teñidas con PI (cubo de filtros de paso largo verde) C) células teñidas con DAPI (cubo de filtros de paso de banda UV);

La figura 11 ilustra imágenes de esplenocitos murinos primarios aislados, células de médula ósea murina y células
sanguíneas humanas, compuestas por el aparato (aumento 2X). Cada panel muestra las imágenes de las mismas
35 células: izquierda; AO, derecha; DAPI;

35

La figura 12 ilustra en A) se muestran células HEK293 teñidas con DACM. B) se muestran células HEK293
transfectadas con una fusión de CMV-RFP. C) Combinación de la imagen A y B, código de color; azul: DACM; rojo:
RFP;

40 La figura 13 ilustra en A) células MCF-7 EC3 teñidas con PI B) células MCF-7 EC3 teñidas con DACM C) células
MCF-7 EC3 que expresan GFP D) figuras A, B y C combinadas (código de color; rojo PI, azul DACM, verde GFP);

La figura 14 ilustra una mezcla de células MCF-7 transfectadas y no transfectadas con GFP. Código de color; rojo; PI
(paso largo verde), verde; GFP (paso de banda azul) y azul; DACM (paso de banda UV);

45

La figura 15 ilustra la cuantificación de ADN celular usando el aparato reivindicado y el citómetro de flujo
FACSCalibur™ (BD Biosciences). Células MCF-7 se fijaron con etanol, se trataron con ARNasa A y se tiñeron con
yoduro de propidio antes del análisis mediante el aparato reivindicado (A + B) y citometría de flujo (C). A) Imagen
capturada por el aparato reivindicado (aumento 2x) B) histograma del contenido de ADN obtenido del aparato
50 reivindicado que presenta la intensidad de fluorescencia en función del número de células. C) histograma del
contenido de ADN obtenido de FACSCalibur;

La figura 16 ilustra una comparación de DAPI y PI para la cuantificación de ADN celular usando el aparato
reivindicado. Histograma del contenido de ADN obtenido del aparato reivindicado que presenta la intensidad de
55 fluorescencia en función del número de células. Panel superior: células JM se fijaron con etanol, se trataron con
ARNasa A y se tiñeron con yoduro de propidio antes del análisis mediante el aparato reivindicado. Panel inferior:
células JM se fijaron con etanol y se tiñeron con DAPI antes del análisis mediante el aparato reivindicado;

La figura 17 ilustra histogramas de ADN de células JM tratadas con diferentes fármacos. El contenido de ADN
60 celular se midió usando, respectivamente, el aparato reivindicado (histogramas grises) y FACSCalibur™

(histogramas blancos);

La figura 18 ilustra histogramas de ADN de células de levadura (*Schizosaccharomyces pombe*). El contenido de ADN celular se midió usando, respectivamente, el aparato reivindicado (histogramas grises) y FACSCalibur™ (histogramas blancos). A) Eg892 incubadas a 36°C durante 4 horas en ausencia de nitrógeno. B) Eg544 incubadas a 30°C durante 3 horas en ausencia de nitrógeno. C) Eg892 incubadas a 36°C durante 4 horas en presencia de nitrógeno. D) Eg816 incubadas a 36°C durante 4 horas en presencia de nitrógeno (escala diferente en comparación con A-C);

10 La figura 19 ilustra a la izquierda; células apoptóticas teñidas con anexina V etiquetada con AlexaFluor 488. Derecha; células no viables teñidas con PI. Fotos capturadas usando el aparato reivindicado a 2 aumentos;

La figura 20 ilustra microscopía fluorescente y contraste de fases de células Jurkat tratadas con camptotecina y teñidas con anexina etiquetada con AF 488 y PI. Las células se microfotografían a 40 aumentos;

15

La figura 21 ilustra histogramas de ADN de células CHO (panel izquierdo) y células JM (panel derecho) tratadas con diferentes fármacos. Las células CHO y JM se cultivaron en ausencia o presencia de, respectivamente, nocodazol y camptotecina. Las células se tiñeron con DAPI y el contenido de ADN se cuantificó usando el aparato reivindicado. Las células detenidas en la fase M y la fase S se indican en la figura. Las células con ADN fragmentado (menos que el contenido de ADN 2C) se marcan como células sub-G₁;

20

La figura 22 ilustra imágenes capturadas usando el aparato reivindicado, aumento digital 2X y óptico 2X. Las células se tiñeron con un conjugado de AF594-anexina V (células apoptóticas, rojo) y se cotiñeron con DACM (células viables, azul) y verde SYTOX (células no viables, verde). A) Células Jurkat no tratadas; menos del 10% de células positivas para el conjugado de AF594-anexina V. B) células Jurkat tratadas con nocodazol; casi el 40% de células positivas para conjugado de AF594-anexina V. C) y D) Cuadro de resultados que muestra el porcentaje de células positivas para anexina V, recuento de células no viables y recuento de células totales de células no tratadas y tratadas con nocodazol, respectivamente;

25

30 La figura 23 ilustra imágenes capturadas usando el aparato reivindicado, aumento 8X. Las células se tiñeron con DACM (células viables, azul), SR-VAD-FMK policaspasa FLICA (células apoptóticas, rojo) y verde SYTOX (células no viables, verde). La columna izquierda muestra imágenes de células CHO no tratadas, la columna de derecha muestra células tratadas con nocodazol;

35 La figura 24 ilustra células Jurkat teñidas con JC-1 y DAPI. Las células se cultivaron en ausencia (parte superior izquierda) o en presencia de camptotecina (CPT) 10 μM durante 5 horas a 37°C (parte superior derecha). Las células se tiñeron con 2,5 μg/ml de JC-1 durante 10 minutos a 37°C, se lavaron con PBS, se resuspendieron en PBS + 1 μg/ml de DAPI y se analizaron usando el aparato reivindicado. En este ejemplo células Jurkat no tratadas son un 20% despolarizadas/apoptóticas mientras que las células Jurkat tratadas con CPT son un 60% despolarizadas/apoptóticas (A). El recuento del número de células positivas para DAPI reveló que la viabilidad de las dos muestras es similar, siendo de aproximadamente el 96% (B). (C) muestra la imagen adquirida a partir de la muestra tratada con CPT; y

40

La figura 25 ilustra A) la imagen de contraste de células T positivas para CD3 de sangre humana se marcó usando un conjugado secundario de R-ficoeritrina (PE) (rojo/rosa). Para visualizar todas las células viables, la muestra de células se cotiñó usando DACM (azul). B) El histograma muestra la intensidad de fluorescencia de células positivas para PE. C) El cuadro de resultados resume la información conseguida incluyendo el porcentaje de células positivas, el recuento de células totales, la intensidad de fluorescencia media de PE, desviación estándar y número principal. Todos los datos se obtuvieron usando el aparato reivindicado y software asociado.

50

Descripción detallada de la invención

El objetivo y ventajas de la presente invención se volverán evidentes para los expertos en la materia tras referencia a la descripción detallada tomada junto con las figuras proporcionadas.

55

De acuerdo con la invención, el aparato para analizar una muestra comprende un plano para muestras sobre el que se dispone la muestra, una unidad de luz de excitación que incluye al menos una fuente de luz para iluminar la muestra, una unidad de detección que comprende al menos un detector que tiene al menos 400.000 elementos de detección activos para detectar una señal de fluorescencia proveniente de la muestra, y una unidad de alineamiento de imagen configurada para generar una imagen alineada a partir de una pluralidad de imágenes, que muestran

60

información espectral diferente, adquiridas a partir de una pluralidad de señales de fluorescencia detectadas de la muestra, obtenidas en condiciones de emisión diferentes o sustancialmente diferentes.

5 La muestra a analizar es una muestra sólida, o sustancialmente sólida, o líquida. La muestra contiene una partícula, que se selecciona de entre una célula animal, tal como una célula de mamífero, insecto y pescado, entre una célula de hongo, tal como una célula de levadura y entre una bacteria.

10 En una realización de la invención, la propia partícula o material contenido sobre o dentro de la partícula es activo fotoluminiscente, generando la señal de fluorescencia cuando la muestra es iluminada con la luz de excitación. En otra realización de la invención, la partícula está etiquetada con un material activo fotoluminiscente, preferentemente un material fluorescente.

15 La muestra o una parte de la muestra se ilumina con la luz de excitación proveniente de una fuente de luz, que emite luz habitualmente en una banda de longitud de onda sustancialmente estrecha. En una realización preferida, la fuente de luz incluye un diodo emisor de luz y/o diodos láser para la iluminación de la muestra. La fuente de luz también puede seleccionarse de entre una fuente de luz en estado sólido y una fuente de luz térmica. Una propiedad altamente preferida de las fuentes de luz en estado sólido es su considerable eficacia de iluminación, particularmente cuando se emplea iluminación en una banda de luz definida. Esto es típico en el análisis de fluorescencia, donde la iluminación del 90% o más de la luz se emite preferentemente en una banda de ondas de 20 nm o menos tal como 10 nm o menos, o incluso 5 nm o menos. En particular, se prefieren bandas de ondas de láser o diodos láser de menos de 5 nm, tales como banda de ondas de 2 nm o menores, preferentemente se prefiere una banda de ondas de 1 nm o menores. Otra propiedad altamente preferida de la fuente de luz en estado sólido es su prolongado tiempo de funcionamiento, por ejemplo tiempo de vida operativa efectiva. Por ejemplo, el tiempo de funcionamiento de los 25 diodos emisores de luz y los láseres de diodo es más prolongado que 2.000 horas, tales como 4.000 horas o más, preferentemente 8.000 horas o más.

30 La fuente de luz se selecciona de entre una fuente de luz dispersiva, un diodo emisor, un diodo láser, un láser, una fuente de luz térmica y una fuente de luz en estado sólido. Además, en aún otra realización de la invención, la unidad de excitación incluye una pluralidad de fuentes de luz que comprenden, tal como al menos dos fuentes de luz diferentes, tal como cuatro fuentes de luz diferentes, tal como al menos seis fuentes de luz diferentes, tal como al menos ocho fuentes de luz diferentes, tal como al menos 10 fuentes de luz diferentes, que emiten luz de diferentes longitudes de onda.

35 En una realización de la invención, la muestra o una parte de la muestra que está siendo analizada se ilumina de una manera, de modo que la variación de la intensidad de la iluminación es menor que un valor predeterminado pero al mismo tiempo, y la eficacia de iluminación, definida como la fracción de luz emitida desde la fuente de luz que ilumina una muestra o parte de la muestra que está siendo analizada, es mayor que un valor predeterminado.

40 De acuerdo con una realización de la invención, la muestra se ilumina usando una unidad de lente, que tiene una agrupación ordenada de microlentes donde la agrupación ordenada de microlentes comprende una pluralidad de lentes dispuestas en una disposición bidimensional, para recibir la luz de excitación y generar una luz de iluminación que es dirigida hacia una región de iluminación del plano para muestras. La unidad de lente produce una luz de iluminación homogénea que se proyectará sobre la región de iluminación del plano para muestras con eficacia de 45 iluminación elevada.

50 En una realización de la invención, la luz de excitación enfocada sobre la agrupación ordenada de microlentes tiene un ángulo de divergencia de 0,1 mrad o menos, preferentemente 0,05 mrad o menos, más preferentemente 0,02 mrad o menos. Cada una de las lentes en la pluralidad de lentes de la agrupación ordenada de microlentes produce una imagen de dimensiones similares a la región de la muestra que está siendo analizada, preferentemente donde la imagen producida es sustancialmente rectangular. La pluralidad de lentes de la agrupación ordenada de microlentes comprende al menos 4 lentes, preferentemente más de 4 lentes, más preferentemente más de 50 elementos de lente, y aún más preferentemente más de 100 lentes. Estas lentes son lentes semiesféricas dispuestas en una agrupación ordenada, preferentemente dos de dichas agrupaciones ordenadas se disponen en una serie, formando de este modo una agrupación ordenada de lentes. La dimensión de la lente está en el intervalo de 0,5 a 3 mm, preferentemente en el intervalo de 1 a 2 mm. El tamaño de la agrupación ordenada de microlentes es menor de 20 mm, siendo el tamaño el diámetro de la agrupación ordenada de lentes en la dirección perpendicular a un eje de excitación-muestra.

60 En otra realización de la invención, la unidad de lente comprende una primera agrupación ordenada de microlentes

en orientación opuesta con una segunda agrupación ordenada de microlentes. La selección de la primera agrupación ordenada de microlentes y la segunda agrupación ordenada de microlentes se basa en potenciar la eficacia de iluminación y/o reducir la variación de iluminación y/o integrar una característica óptica de un elemento óptico independiente en el efecto óptico de la agrupación ordenada de lentes. La agrupación ordenada de microlentes está alojada en una cubierta que comprende medios para disponer y fijar la agrupación ordenada de microlentes. Esta cubierta está hecha habitualmente de polímero moldeado. El patrón de las lentes preferentemente es similar a la forma del haz de la luz de excitación.

En una realización de la invención, la región de iluminación es al menos 2 veces más grande que el tamaño del área de emitancia de la fuente de luz. La región de iluminación en investigación solamente es expuesta a la luz de iluminación, evitando de este modo el desvanecimiento de la señal de fluorescencia. La muestra no en investigación sustancialmente no es expuesta a iluminación, preferentemente donde la iluminación da como resultado alteración de la propiedad química y/o física de la muestra, tal como desvanecimiento de la señal fluorescente.

La estructura de la fuente de luz, con respecto a la parte emisora de luz de la fuente de luz es de importancia esencial, con el fin de obtener iluminación con alta eficacia y baja variación para la iluminación de material de muestra de fotoluminiscencia. Por lo tanto, varias realizaciones altamente preferidas de la presente invención usan fuentes de luz "Power LED" con un elemento de emitancia homogénea, tal como es disponible en varias fuentes de luz semiconductoras disponibles en el mercado (por ejemplo LZ1-00G105 de LedEgin, LED XLamp 7090 de Cree, Luxeon K2 de Lumiled, NS6B083T de Nichia o la Golden Dragon (LD W51M) de Osram). En general, varias realizaciones preferidas de la presente invención incluyen una luz seleccionadas de entre una fuente de luz dispersiva, un diodo emisor, un diodo láser y un láser, preferentemente donde el elemento de emitancia de tamaño físico sustancial, tal como por ejemplo mayor de 0,5 mm², o incluso mayor de 1,0 mm².

Se ha descubierto que cuando se usan fuentes de luz donde los elementos emisores de luz tienen distintas estructuras, tales como lámpara o un diodo emisor de luz (es decir, LED), o en general fuentes de luz, que forman una imagen o estructura cuando son enfocadas, que es posible iluminar un material de muestra considerablemente grande, mientras se mantiene tanto iluminación altamente homogénea como buena eficacia de luz emitida. La iluminación homogénea se define mediante la variación de la energía de iluminación a través del material de muestra. La eficacia de iluminación se define por la relación de luz de iluminación con respecto a luz emitida. La presente invención ofrece una mejora sustancial de varias aplicaciones de fotoluminiscencia, tales como microscopía fluorescente. Generando una iluminación homogénea fuerte del material de muestra, es posible realizar análisis de fotoluminiscencia de alta calidad de una manera más rápida y sencilla, permitiendo de este modo el uso de un diseño de instrumental más sencillo y robusto.

Una fuente de luz dispersiva, tal como LED, emite luz virtualmente en todas direcciones. Con el fin de usar dicha fuente de luz en una aplicación tal como un microscopio de fluorescencia, es necesario, por lo tanto, enfocar la luz sobre el material de muestra. Dicho enfoque produce una imagen de la fuente de luz, que puede ser de dimensiones comparables al campo de visión del microscopio. Por otro lado, la intensidad de luz emitida en el campo de visión es una imagen de la fuente de luz, y, por lo tanto, incluso aunque es posible iluminar el material de muestra con buena eficacia, la intensidad de la iluminación varía considerablemente de una parte del material de muestra a otra.

Una realización a menudo preferida de la presente invención usa una serie de lentes para enfocar luz proveniente de una fuente de luz dispersiva. A menudo se prefiere que dichas lentes sean una serie de lentes sustancialmente idénticas, preferentemente lentes dispuestas en una agrupación ordenada de lentes, tal como agrupaciones ordenadas de microlentes. Varias realizaciones preferidas de la presente invención usan dos agrupaciones ordenadas de microlentes sustancialmente idénticas, dispuestas en un par con orientación opuesta, mientras que otras realizaciones igualmente preferidas usan un elemento individual, que comprende agrupaciones ordenadas de microlentes en dos superficies opuestas. En una realización que usa un elemento individual de agrupaciones ordenadas de microlentes, el elemento individual se produce preferentemente mediante un procedimiento de moldeo, moldeando un material sustancialmente ópticamente transparente, tal como vidrio o polímero.

Una propiedad preferida de la luz transmitida a través de una agrupación ordenada de microlentes, es el alto grado de luz paralela, y por lo tanto varias realizaciones preferidas de la presente invención incluyen uno o más elementos de lente, tales como la agrupación ordenada de microlentes, lo que aumenta el grado de paralelismo de la luz que sale de la fuente de luz y entra en la agrupación ordenada de microlentes.

En varias realizaciones preferidas de la presente invención, que usan elementos de agrupación ordenada de microlentes, las agrupaciones ordenadas de microlentes a ambos lados son sustancialmente idénticas en forma, y preferentemente también en posición, mientras que, en otras realizaciones igualmente preferidas, la forma y/o

posición de los elementos de las agrupaciones ordenadas de microlentes son sustancialmente diferentes, preferibles donde dicha diferencia potencia la eficacia de iluminación y/o reduce la variación de iluminación y/o integra una característica óptica de un elemento óptico independiente, tal como una lente, en el efecto óptico del elemento de agrupación ordenada de microlentes.

5

En varias realizaciones preferidas, la imagen de la fuente de luz producida por una lente sustancialmente recuerda a la región del material de muestra que está siendo investigada, preferentemente recordando estrechamente la relación de altura/anchura de la región o imagen fotoluminiscente detectada.

- 10 Cuando se usan una serie de lentes idénticas, a menudo se prefiere que dichas lentes se dispongan en un elemento individual, por ejemplo una agrupación ordenada de microlentes. Además de usar una agrupación ordenada de microlentes, varias realizaciones preferidas de la presente invención incluyen además una o más lentes, preferentemente donde el propósito de dichas una o más lentes es colimar luz proveniente de la fuente de luz y/o aumentar el ángulo espacial a través del cual se recoge luz proveniente de la fuente de luz. En otra realización de la
- 15 invención, se proporciona una unidad de colimación para recibir la luz de excitación y generar una luz de excitación colimada. La unidad de colimación incluye una lente o una agrupación ordenada de lentes. La unidad de colimación aumenta el ángulo espacial a través del cual se recoge la luz de excitación proveniente la unidad de excitación.

- Una propiedad a menudo preferida de usar una serie de lentes o elementos de lente idénticos, tales como una
- 20 agrupación ordenada de microlentes, es que es posible eliminar la formación de imágenes de cualquier estructura en la fuente de luz, tal como un filamento de una lámpara. Si se forman imágenes de dicha estructura en el material de muestra, la intensidad de luz iluminada varía de acuerdo con la estructura de la fuente de luz de la que se formaron imágenes. Dicha estructura no puede eliminarse mediante componentes ópticos de imagenología convencionales y normalmente requeriría procedimientos tales como desenfoque o difusión de luz, donde el resultado de dichos
- 25 procedimientos daría como resultado, en general, la reducción de la eficacia de iluminación. Varias realizaciones preferidas de la presente invención incluyen agrupaciones ordenadas de microlentes que están comprendidas en un elemento individual, preferentemente un elemento producido moldeando material ópticamente transparente, preferentemente un material polimérico en un molde.

- 30 Cuando se produce un elemento de agrupación ordenada de microlentes moldeando material polimérico, a menudo se prefiere usar un grosor considerablemente pequeño. Dicho grosor pequeño se obtiene normalmente usando elementos de lente pequeños, tales como elementos de lente de 3 mm o menos de diámetro, tales como 2 mm o menos de diámetro, incluso 1 mm o menos, tal como 0,5 mm o menos. Normalmente dichos elementos de agrupación ordenada de microlentes son de menos de 10 mm de grosor, tales como 8 mm o menos, tales como 5
- 35 mm o menos, incluso 3 mm o menos. Dependiendo del procedimiento usado para producir el molde usado para moldeo, a menudo es de interés usar lentes de cierto diámetro, tales como lentes de 0,5 mm de diámetro o más, tales como 1 mm o más, tales como 2 mm o más, tales como 3 mm o más. De este modo, a menudo se prefiere que el diámetro de las lentes esté en el intervalo de 0,5 a 3 mm, preferentemente en el intervalo de 1 a 2 mm.

- 40 En varias realizaciones preferidas de la presente invención, el tamaño de la agrupación ordenada de microlentes es menor de 20 mm, tal como 15 mm o menos, tal como 10 mm, en ciertas realizaciones aún más pequeño, tal como 8 mm o menos, tal como 5 mm o menos, siendo el tamaño el diámetro de la agrupación ordenada de lentes en la dirección perpendicular al eje principal de iluminación.

- 45 Varias realizaciones preferidas de la presente invención usan una única fuente de luz, por ejemplo diodo emisor, diodo láser o láser como fuente de luz, mientras que otras realizaciones igualmente preferidas usan dos o más fuentes de luz, preferentemente en un único conjunto. En muchas de estas realizaciones, se prefiere que las dos o más fuentes de luz sean idénticas, con respecto a una propiedad óptica, mientras que, en otras realizaciones igualmente preferidas, al menos dos fuentes de luz son diferentes, con respecto a una propiedad óptica.

- 50 Generalmente, dos o más fuentes de luz idénticas son capaces de generar un mayor flujo de luz, mientras que dos o más fuentes de luz diferentes añaden flexibilidad con respecto a propiedades tales como longitud de onda de la luz emitida.

- En otras realizaciones de la invención, las dos o más fuentes de luz se disponen con respecto a al menos otra
- 55 unidad del aparato y/o al plano para muestras. Dicha disposición comprende el movimiento relativo de la fuente de luz respecto a al menos otra unidad y/o el plano para muestras en 1 mm o menos. La disposición afecta a la homogeneidad de la luz de iluminación sobre la región de iluminación, preferentemente donde una disposición ideal da como resultado la variación de iluminación mínima.

- 60 Varias realizaciones preferidas de la presente invención incluyen procedimientos para producción, que pueden

colocar la fuente de luz con respecto a al menos uno de los componentes ópticos, de tal manera que se obtenga una eficacia de iluminación y/o variación de la intensidad de iluminación satisfactorias.

5 Esto se obtiene preferentemente incluyendo medios que permiten que la fuente de luz se coloque en un plano (plano de la fuente de luz) paralelo al plano de la región de iluminación, con precisión de posición mejor que 1 mm, tal como mejor que 0,5 mm, o incluso mejor que 0,2 mm, tal como con una variación de precisión de 0,1 mm o inferior. Además, varias realizaciones incluyen procedimientos para producción, que pueden colocar la fuente de luz y al menos un elemento óptico en posición una con respecto al otro, en una dirección paralela a la dirección principal de luz iluminada. Esto se obtiene preferentemente incluyendo medios que permiten que la fuente de luz y/o al menos un
10 elemento óptico se coloquen una con respecto al otro, con precisión en posición mejor que 0,1 mm, tal como mejor que 0,5 mm, o incluso mejor que 0,2 mm, tal como con una precisión de 0,1 mm o mejor.

A menudo, se prefiere incluir una unidad de separación de longitudes de onda, por ejemplo un filtro óptico, en el medio de iluminación, preferentemente donde el propósito es definir una región de iluminación o polaridad de luz de
15 iluminación. La unidad de separación de longitudes de onda es un medio de filtro espectral seleccionado de entre un filtro de interferencia, filtro de absorción y filtro de excitación.

Una realización preferida de la presente invención permite que la fuente de luz se coloque cerca del material de muestra que está siendo analizado. Esto permite la construcción de un sistema óptico compacto, dado que el medio
20 de iluminación, que incluye la fuente de luz y componentes ópticos, puede ser de longitud a lo largo del eje óptico del sistema más corta que 100 mm, preferentemente más corta que 60 mm, más preferentemente más corta que 40 mm, preferentemente incluso más corta que 20 mm, tal como más corta que 15 mm.

Varias realizaciones preferidas de la presente invención tienen el medio de iluminación dispuesto en, o
25 sustancialmente en, el eje óptico de un sistema de imagenología fotoluminiscente, preferentemente en una disposición donde el flujo de luz de iluminación tiene una dirección general hacia el sistema detector del sistema de imagenología. Otras realizaciones igualmente preferidas de la presente invención tienen el medio de iluminación dispuesto sustancialmente fuera del eje óptico de un sistema de imagenología, preferentemente en una disposición que incluye un espejo dicróico que refleja la luz de iluminación sobre la muestra a lo largo del eje del sistema de
30 imagenología.

Una propiedad a menudo preferida de realizaciones de la presente invención es que es posible iluminar material de muestra con luz homogénea con alta eficacia sin el uso de un elemento/disposición difusora o desenfocante. En otra
35 realización de la invención, la eficacia de iluminación y la variación de iluminación se obtienen sin desenfoque sustancial de las unidades del medio de iluminación.

Una propiedad a menudo preferida de realizaciones de la presente invención es que regiones del material de muestra, no en investigación, sustancialmente no están expuestas a iluminación. Ésta es a menudo una propiedad deseable, preferentemente donde el resultado de la iluminación es la alternación de una propiedad química y/o física
40 del material de muestra, tal como desvanecimiento de la señal fluorescente.

La unidad de detección, que comprende al menos un primer detector, recoge la señal de fluorescencia, que representa una imagen, proveniente de la muestra. El primer detector detecta señales procedentes de la muestra, adquiriendo de este modo una imagen de la muestra. El detector es un dispositivo de detección de imágenes, tal
45 como un dispositivo de carga acoplada (CCD) o un dispositivo semiconductor complementario de óxido metálico (CMOS). El detector se caracteriza preferentemente por una dimensión preferida de área activa, número preferido de elementos de detección activos, por ejemplo píxeles, y sensibilidad preferida, por ejemplo sensibilidad a luz detectada. El aparato preferentemente usa una o más lentes para la generación de una imagen de la muestra, donde la disposición de dichas lentes determina el enfoque y el aumento óptico del sistema.

50 En aún otra realización de la invención, el detector incluye una agrupación ordenada de elementos de detección activos. Estos elementos de detección activos se disponen preferentemente en una disposición bidimensional que permite la adquisición simultánea de información espacial a partir de la muestra que está siendo analizada. El detector preferentemente comprende una agrupación ordenada de elementos de detección tales como al menos
55 100.000 elementos de detección activos, tales como 400.000 elementos de detección activos o más, tales como 1.000.000 de elementos de detección activos o más, preferentemente 2.000.000 de elementos de detección activos o más. Dicho alto número de los elementos de detección activos se prefiere habitualmente cuando los análisis de la muestra incluyen la determinación de información espacial de partículas biológicas en la muestra. Cuando el análisis de la muestra incluye la determinación de información espacial de partículas biológicas en la muestra, varias
60 realizaciones preferidas de la presente muestra incluyen elementos de detección activos, que son de menos de 10

μm de tamaño, siendo el tamaño la más larga de la anchura o la altura de los elementos de detección, preferentemente donde el tamaño de los elementos de detección activos es $5 \mu\text{m}$ o menos, preferentemente $3 \mu\text{m}$ o menos.

- 5 En otra realización de la invención, el aparato incluye una primera unidad de enfoque/medio para enfocar la luz de excitación sobre la muestra. En aún otra realización de la invención, el aparato incluye una segunda unidad de enfoque/medio para enfocar la señal de fluorescencia sobre la unidad de detección. La primera unidad de enfoque y la segunda unidad de enfoque son normalmente una lente o una agrupación ordenada de lentes. En muchas realizaciones preferidas de la presente invención, el enfoque se realiza moviendo una o más lentes de la primera
- 10 unidad de enfoque y/o la segunda unidad de enfoque. El enfoque también mantiene una longitud sustancialmente fija del aparato, es decir, la distancia desde un plano focal, donde la muestra está ubicada, hasta un plano de la imagen, donde está ubicada la unidad de detección. Preferentemente, el enfoque se realiza registrando una serie de imágenes de una estructura predeterminada, donde el punto de enfoque se determina mediante una o más propiedades de dicha estructura predeterminada, tales como dimensión o intensidad. Preferentemente, el aparato se
- 15 caracteriza de una manera, de modo que el área del campo de visión pueda determinarse o estimarse después de tener en cuenta los cambios en el enfoque. En diversas realizaciones de la invención, la primera unidad de enfoque y la segunda unidad de enfoque proporcionan un aumento óptico fijo de 40X o menos, preferentemente 20X o menos, más preferentemente 10X o menos.
- 20 En otra realización de la invención, se prefiere que la longitud física del aparato sea sustancialmente la misma incluso en condiciones que permiten la realización de diferentes análisis ópticos, tal como longitud de onda variable en microscopía de transmisión o dispersión, longitudes de onda de excitación/emisión variables en microscopía de fluorescencia, aumento o enfoque. Un aparato construido de esta manera ofrece ventajas mecánicas considerables, tales como una producción más sencilla y robustez mecánica mejorada. Esto se consigue usando uno o más de
- 25 procedimientos de diseño preferidos, tales como selección de componentes ópticos, por ejemplo con respecto a grosor y/o curvatura. Cuando se produce el aparato con una longitud física fijada, normalmente se prefiere permitir el ajuste del enfoque mediante movimiento de un componente óptico, tal como una lente, a lo largo de la dirección de la trayectoria óptica. El grado de enfoque se determina preferentemente determinando la propiedad de imagenología de uno o más objetos visibles en el sistema, tal como determinando un tamaño de una imagen de uno o más
- 30 objetos.

Realizaciones preferidas de la presente invención, incluyen un aparato con un aumento óptico fijo, preferentemente donde el aumento óptico es bajo, tal como donde es menor que 10 veces, tal como 6 veces o menos, tal como 4 veces o menos, tal como 2 veces o menos. Varias realizaciones preferidas de la presente invención incluyen

35 aparatos, que producen una imagen sustancialmente sin ningún aumento, es decir, imagenología unívoca. Normalmente, se prefiere aumento óptico bajo cuando las partículas que están siendo analizadas son de aproximadamente $20 \mu\text{m}$ o menos de tamaño.

- En otras realizaciones igualmente preferidas, el aumento óptico es 10 veces o mayor, tal como 15 veces o mayor, tal como 20 veces o mayor. Dicho aumento óptico se prefiere normalmente cuando se analizan partículas pequeñas, y/o cuando la señal detectada a partir de una partícula es baja, tal como cuando el número de sitios detectables en una partícula es considerablemente bajo. Normalmente, el aumento óptico preferido en dicho análisis está en el intervalo entre 10 y 40 veces, tal como entre 15 y 30 veces.

- 45 En otra realización de la invención, el aumento óptico del aparato, definido por las dimensiones de motivo y la imagen del motivo en el detector es de una magnitud predeterminada. El aumento puede alterarse cambiando la posición de una o más unidades del aparato. Preferentemente, el aumento se cambia moviendo una o más lentes. Preferentemente, el aumento se cambia sin cambiar sustancialmente la longitud del aparato, es decir, la distancia desde el plano focal, donde está ubicada la muestra, hasta el plano de la imagen, donde está ubicada la unidad de
- 50 detección. El aparato normalmente proporciona un aumento de 40X o menos, preferentemente 20X o menos, más preferentemente 10X o menor.

- En otra realización de la invención, un filtro de luz de excitación se inserta en una trayectoria de luz de excitación dirigida desde al menos una de las fuentes de luz, para separar la luz de excitación en una pluralidad de bandas de
- 55 longitud de onda de excitación antes de la iluminación de la muestra. La trayectoria de luz de excitación es la trayectoria desde el centro del haz de luz de excitación hasta el plano para muestras.

- Análogamente, en otra realización de la invención, un filtro de luz de emisión puede insertarse en una trayectoria de luz de emisión dirigida a al menos uno de los detectores, para separar la señal de fluorescencia en una pluralidad de
- 60 bandas de longitud de onda de emisión antes de la detección de la señal de fluorescencia en la unidad de detección.

La trayectoria de luz de emisión es la trayectoria desde el plano para muestras hasta la unidad de detección.

El filtro de luz de excitación y el filtro de luz de emisión para separación de la luz de excitación y la señal de fluorescencia se selecciona entre un filtro de interferencia, filtro de absorción, filtro de paso bajo, filtro de paso alto y
 5 filtros de paso de banda. En varias realizaciones preferidas, los filtros pueden ser filtros de paso alto, es decir, un filtro que sustancialmente transmite luz a longitud de onda alta, mientras que bloquea la luz a longitud de onda baja, normalmente preferidos como filtros de emisión en microscopía de fluorescencia, filtros de paso bajo, es decir, que sustancialmente transmiten luz a longitud de onda baja mientras que bloquean luz a longitud de onda alta, normalmente preferidos como filtros de excitación en microscopía de fluorescencia. Varias realizaciones preferidas
 10 incluyen filtros de paso de banda, por ejemplo que sustancialmente transmiten en una banda de longitud de onda, mientras que longitudes de onda más altas y más bajas son bloqueadas, normalmente dichos filtros se prefieren en microscopía de fluorescencia, donde el sistema en investigación incluye múltiples posibilidades de excitación y/o emisión.

15 En varias realizaciones altamente preferidas de los presente sistemas, medios de separación de longitudes de onda, facilitan la investigación de dos o más propiedades de una partícula, tal como identificación de una partícula o separación de dos o más grupos de partículas. Preferentemente, dicha identificación o separación por propiedades de longitud de onda se realiza registrando dos o más imágenes de la misma muestra, mientras que la muestra y la partícula de la muestra está/están sustancialmente en la misma configuración geométrica en dichas dos o más
 20 imágenes, donde dichas dos o más imágenes reflejan propiedades de longitud de onda diferentes o sustancialmente diferentes.

En otra realización de la invención, medios de separación de longitudes de onda tales como filtros, facilitan la investigación de dos o más propiedades de una partícula, tales como identificación de una partícula o separación de
 25 dos o más grupos de partículas. Preferentemente, dicha identificación o separación por propiedades de longitud de onda se realiza registrando dos o más imágenes de la misma muestra, mientras que la muestra y la partícula de la muestra está/están sustancialmente en la misma configuración geométrica en dichas dos o más imágenes, donde dichas dos o más imágenes reflejan propiedades de longitud de onda diferentes o sustancialmente diferentes.

30 La muestra se analiza en dos o más combinaciones de bandas de ondas de excitación y emisión seleccionando una combinación de filtros de luz de emisión y filtros de luz de excitación. Estas combinaciones permiten en uso de al menos un filtro de luz de excitación o de emisión en dos o más combinaciones respectivamente.

En una realización preferida de la presente invención, preferentemente cuando se registra información fluorescente,
 35 el filtro de luz de emisión se dispone en un lado opuesto de la muestra que está siendo analizada, respecto a la fuente de excitación.

Varias realizaciones de la presente invención incluyen un sistema óptico para análisis de fluorescencia, donde la unidad de excitación y la unidad de detección se colocan a ambos lados del plano para muestras, por ejemplo
 40 fluorescencia de transmisión, en oposición a una disposición donde la unidad de excitación y la unidad de detección están en el mismo lado del plano para muestras y la luz de excitación y la luz de emisión se transmiten sobre la muestra a través del uso de espejos y/o lentes, por ejemplo sistema de epifluorescencia. Dichos sistemas de fluorescencia de transmisión se prefieren en varias realizaciones, normalmente donde ofrecen un dispositivo mecánico y/o óptico más sencillo. Aunque el alineamiento directo de la fuente de excitación y el detector se prefiere
 45 a menudo, otras realizaciones, incluyendo alineamiento sustancial, por ejemplo donde la divergencia de la línea de disposición paralela es generalmente menor que 10 grados, también se implementan.

En otra realización de la invención, una muestra que da origen a una pluralidad de información espectral, tal como la emitancia de luz fluorescente a varias longitudes de onda, se analiza registrando dos o más imágenes en
 50 condiciones donde cada imagen registrada sustancialmente contiene todas las longitudes de onda en consideración, pero preferentemente a diferentes intensidades. Una manera preferida de obtener esto emplea un medio de modulación espectral en la trayectoria óptica, preferentemente usando un interferómetro, tal como un interferómetro de Michelson.

55 Varias realizaciones preferidas de la presente invención incluyen medios para separar la luz en dos o más componentes de longitud de onda, donde dichos medios incluyen medios que modulan la luz, tales como un interferómetro de Michelson y/o Fabry-Perrot. Varias realizaciones preferidas también incluyen medios de modulación, tales como interferómetros, donde la modulación se genera cambiando diferencias de trayectoria óptica. Se prefiere que dicha diferencia de trayectoria es pequeña, tal como menor que 800 μm , tal como 400 μm o menos,
 60 preferentemente 200 μm o menos, más preferentemente 100 μm o menor.

- En otras realizaciones de la presente invención, basándose en resolución de longitud de onda limitada, la diferencia de trayectoria óptica de los medios de modulación es menor que 100 μm , tal como 80 μm o menos, preferentemente 40 μm o menor. En otras realizaciones de la presente invención, basándose en resolución de longitud de onda moderada, la diferencia de trayectoria óptica está en el intervalo de 20 μm a 200 μm , preferentemente en el intervalo de 40 μm a 100 μm . En varias realizaciones preferidas, la resolución de longitud de onda obtenible usando el medio de modulación no es mayor que 10 nm, tal como 20 nm o más pequeño, tal como 40 nm, o incluso tan pequeño como 80 nm, estando definida la resolución como la diferencia de longitud de onda más pequeña que puede separarse adecuadamente.
- 10 El medio de modulación preferido para separar la luz permite la adquisición de imágenes de luz modulada a virtualmente cualquier diferencia de trayectoria óptica, preferentemente con precisión y resolución en posición mejor que 1 μm , cuando se expresa como la diferencia de trayectoria óptica del medio de modulación, tal como 0,5 μm o mejor, preferentemente 0,1 μm o mejor, más preferentemente 0,02 μm o mejor. A cualquier diferencia de trayectoria
- 15 óptica dada, el medio de modulación puede mantener sustancialmente la diferencia de trayectoria óptica durante un tiempo considerable, preferentemente durante un tiempo que es comparable al tiempo de exposición del detector, tal como manteniendo sustancialmente la diferencia de trayectoria óptica durante 1 ms o más, tal como durante 10 ms o más, preferentemente 50 ms o más, más preferentemente 100 ms o más.
- 20 En realizaciones donde la intensidad de la luz detectada es baja, se prefiere que el medio de modulación pueda mantener sustancialmente la diferencia de trayectoria óptica de 200 ms o más, tal como 400 ms o más, preferentemente 600 ms o más, más preferentemente 800 ms o más. Cuando los medios de modulación incluyen medios para el movimiento de uno o más componentes ópticos, tales como un espejo o un divisor del haz, el movimiento es provocado preferentemente por uno o más accionadores piezoeléctricos.
- 25 Cuando se determinan propiedades de longitud de onda de la luz usando el medio de modulación, el número de imágenes registradas a modulación diferente es igual al número de diferentes bandas de longitud de onda de interés, preferentemente el número de imágenes es mayor que el número de diferentes bandas de ondas, tal como 2 veces el número de bandas de ondas, preferentemente 3 o 4 veces el número de bandas de ondas. En otras
- 30 realizaciones de la invención, el número de imágenes registradas a diferente modulación es más de 4 veces el número de bandas de ondas de interés, tal como 8 o más veces, preferentemente 10 o más veces.
- En aún otra realización de la invención, se usa un accionador para mover el plano para muestras y/o al menos una de las unidades para modular la luz emitida desde la muestra.
- 35 En otra realización de la invención, se registran dos o más imágenes de la misma muestra, que muestran propiedades espectrales diferentes, tales como emisión de fluorescencia, donde la posición de los objetos en la imagen registrada es sustancialmente igual en al menos dos de las imágenes. Cuando se registran imágenes a diferentes longitudes de onda espectrales, tales como cuando se registran intensidades fluorescentes, esto hace
- 40 posible relacionar diferente información espectral con un objeto específico o una partícula, combinando información proveniente de dos o más imágenes, que representa longitudes de onda espectrales diferentes o sustancialmente diferentes. Cuando se usan filtros ópticos para separar longitudes de onda espectrales, esta característica es difícil de obtener, a menos que se preste mucha atención a la posición y el alineamiento de dichos filtros ópticos, dado que la diferencia del índice de refracción habitualmente causa aberración y realizaciones preferidas de la presente
- 45 invención usan medios de selección de filtros ópticos que funcionan con alta precisión, preferentemente obtenidos mediante el uso de medios mecánicos con tolerancias pequeñas. Un procedimiento preferido de compensar la aberración espectral es cambiar la posición de uno o más componentes ópticos, tales como una lente o los detectores, o la muestra, de una manera predeterminada, reduciendo o compensando de este modo cambios de posición cuando se registran imágenes que representan dos o más propiedades espectrales.
- 50 De acuerdo con la invención, se usa una unidad de alineamiento de imagen. La unidad de alineamiento de imagen genera una imagen alineada a partir de una pluralidad de imágenes, que muestran información espectral diferente, adquiridas a partir de una pluralidad de señales de fluorescencia de la muestra obtenida en condiciones de emisión diferentes o sustancialmente diferentes. En una realización, el aparato comprende además al menos dos filtros de
- 55 emisión diferentes capaces de filtrar señales emitidas desde las partículas hacia el detector. En diversas realizaciones de la invención, el aparato incluye al menos 4 filtros de emisión diferentes, tales como al menos 6 filtros de emisión diferentes, tales como al menos 10 filtros de emisión diferentes, tales como al menos 15 filtros de emisión diferentes, tales como al menos 20 filtros de emisión diferentes.
- 60 Donde se usan dos o más bandas de ondas de emisión o transmisión para el análisis de la misma muestra o

material de muestra, se prefiere incluir un procedimiento de alineamiento de imágenes. El alineamiento de imágenes genera imágenes alineadas de la misma muestra o material de muestra adquiridas en dos condiciones de emisión diferentes o sustancialmente diferentes, donde la diferencia en la posición de un objeto en las imágenes alineadas es menor que 10 píxeles, tal como 8 píxeles o menos, tal como 4 píxeles o menos, preferentemente incluso 2 píxeles o menos, determinada como la diferencia promedio en la posición de objetos. El alineamiento de imágenes puede conseguirse aplicando una transformación predeterminada a una imagen recogida, transformando la imagen recogida en imagen alineada. Preferentemente, dicha transformación predeterminada se deriva de la medición de una imagen que comprende objetos, que producen una estructura identificable en la imagen recogida, donde dichos objetos son visibles en imágenes recogidas en dichas condiciones de emisión diferentes y mantienen su posición o posición relativa durante la adquisición de dos o más imágenes que representan dichas condiciones de emisión diferentes. Cuando el desalineamiento es relativamente sencillo, por ejemplo principalmente desplazamiento de posición, se prefiere usar variables que se refieren a cada una de dos coordenadas de la imagen, por ejemplo variables de desplazamiento. Sin embargo, si el desalineamiento incluye cambios de aumentos, a menudo se prefiere usar variables independientes que se refieren a cada una de las dos coordenadas, por ejemplo factor para aumento en una dirección y otro factor para aumento en otra dirección. Otras realizaciones igualmente preferidas incluyen además variables que refieren a ambas direcciones, por ejemplo variables que reflejan el desplazamiento y/o el aumento que se determina en la posición en la imagen. Normalmente, la transformación es sustancialmente una transformación de desplazamiento, preferentemente donde la transformación puede expresarse como desplazamiento de un número definido de píxeles en dirección horizontal y/o vertical de la imagen. El grado de desplazamiento en la transformación de desplazamiento depende sustancialmente de la posición en la imagen, preferentemente donde el desplazamiento horizontal y/o vertical se define como un desplazamiento constante y desplazamiento variable determinados como una fracción del índice de píxel de la imagen. El grado de desplazamiento en dirección horizontal y/o vertical se expresa como una función polinómica del índice del píxel de la imagen.

En aún otra realización de la invención, se usa una unidad de control para mover el plano para muestras/portamuestras a una posición predeterminada con respecto al campo de visión de la unidad de detección.

En una realización de la invención, la unidad de luz de excitación y la unidad de detección se colocan en ambos lados del plano para muestras. Sin embargo, en aún otra realización de la invención, la unidad de luz de excitación y la unidad de detección se colocan en el mismo lado del plano para muestras.

En otra realización de la invención, un procesador se acopla a la unidad de detección para recibir datos de señal de la señal de fluorescencia provenientes de la unidad de detección, para procesar los datos de señal, correlacionar los datos de señal con un parámetro a valorar, y valorar el parámetro. El aparato incluye además un medio para controlar la adquisición de al menos dos imágenes del mismo volumen de la muestra, donde la información proveniente de dichas dos imágenes representa longitudes de onda espectrales diferentes.

En aún otra realización de la invención, se proporciona la compensación para grosor variable de un portamuestras que contiene una muestra líquida, preferentemente cuando el grosor de la muestra tiene influencia en el resultado del análisis que está siendo realizado, tal como la determinación del número de partículas por volumen de muestra. Esto se realiza aplicando una insignia al portamuestras, o una parte unida al portamuestras, o en cualquier forma para correlacionar información relativa a las dimensiones físicas del portamuestras con cada medición tomada de la muestra en el portamuestras. En particular, cuando se mide en dos o más posiciones independientes, o parcialmente independientes en el portamuestras, se prefiere que la diferencia del grosor en las posiciones independientes pueda tenerse en consideración.

Cuando se determina el número de partículas por volumen de muestra, es necesario determinar el volumen de muestra analizado. Por lo tanto, varias realizaciones de la presente invención incluyen medios para registrar información y/o determinar propiedades relativas a al menos una dimensión del portamuestras, preferentemente el grosor de la muestra en el portamuestras en la dirección enfrentada al detector. El registro de información relativa al grosor preferentemente implica leer una insignia que refleja una predeterminación de la propiedad dimensional, por ejemplo el grosor. Preferentemente dicha insignia puede ser leída por uno o más sensores del aparato, normalmente donde dicha insignia es una representación en patrón de información, tal como información en código binario o código de barras. Varias realizaciones de la presente invención permiten el análisis de dos o más segmentos del portamuestras, preferentemente cuando el propósito es aumentar el volumen total de analizada y/u obtener una mejor representación de la muestra que está siendo analizada, entonces preferentemente la insignia refleja la dimensión física de dichos dos o más segmentos del portamuestras. Realizaciones adicionales de la presente invención incluyen medios para determinar la dimensión física del portamuestras, preferentemente donde es posible realizar dicha determinación en una o más posiciones predeterminadas del portamuestras. Varias realizaciones

preferidas de la presente invención leen la insignia y/o determinan la dimensión física usando un primer detector de insignias, preferentemente el primer detector de insignias es el mismo que el detector que se usa para detectar imágenes de la muestra con el propósito del análisis de partículas. Preferentemente, el al menos un parámetro registrado o determinado tiene una graduación mínima, y además donde las etapas de la graduación son el 10% o menos, cuando se expresa como una fracción de un valor típico de dicho parámetro, preferentemente el 8% o menor, más preferentemente 6% o menor, más preferentemente 4% o menor, más preferentemente 2% o menor. En varias realizaciones preferidas dicha graduación es por etapas iguales, mientras que en otras realizaciones igualmente preferidas la graduación es en etapas sustancialmente desiguales, tales como cuando el tamaño de una etapa es de tamaño relativo sustancialmente igual, con respecto a dicho parámetro.

10 En otra realización de la presente invención, se proporciona un medio capaz de determinar el tipo de portamuestras que contiene la muestra que está siendo analizada. Preferentemente, dicha determinación se realiza leyendo una insignia que identifica el tipo de dicho portamuestras y/o detectando la forma, el tamaño u otra propiedad física de dicho portamuestras. Preferentemente, donde dicha detección se realiza usando un segundo detector de insignias, 15 preferentemente dicho segundo detector de insignias es el mismo que el detector que se usa para detectar imágenes de la muestra con el propósito de análisis de partículas.

En otra realización de la invención, se proporciona un portamuestras, que está adaptado para sostener dos o más tipos diferentes de dispositivos para muestras, con poca o ninguna adaptación. Uno de dichos dispositivos para 20 muestras es un portaobjetos de microscopía tradicional, o una cámara de hemocitómetro, tal como una cámara de Büchner. Preferentemente, los diferentes dispositivos para muestras se colocan sobre o en un portadispositivos para muestras, preferentemente donde el portadispositivos para muestras es móvil, y el movimiento de dicho portadispositivos para muestras se controla mediante un medio de control, que es capaz de dirigir el portadispositivos para muestras de acuerdo con el tipo de dispositivo para muestras usado.

25 En otra realización de la invención, el portamuestras está controlado por una unidad de control, donde la unidad de detección se usa para monitorizar o detectar una o más información relativa a la muestra que está siendo analizada y/o al dispositivo para muestras usado. Preferentemente, la información que está siendo detectada es información que identifica las partículas en la muestra o propiedades de las partículas en la muestra y/o el portamuestras o las 30 propiedades del portamuestras. Preferentemente la unidad de control mueve el portamuestras a una o más posiciones predeterminada con respecto al campo de visión de la unidad de detección, permitiendo de este modo la detección de una o más informaciones. En realizaciones preferidas de la presente invención, la información que está siendo detectada es información estacionaria, es decir, información que no cambia durante el proceso de análisis, por ejemplo, a lectura de una insignia, que representa una propiedad dimensional predeterminada del 35 portamuestras. Mientras que, en otras realizaciones, la información que está siendo detectada es información dinámica, por ejemplo, movimiento de la muestra o una parte del dispositivo para muestras, o indicación de una propiedad química y/o física de la muestra.

En otra realización de la invención, se potencia la resolución de la señal de fluorescencia detectada por la unidad de 40 detección, donde la resolución de la señal de fluorescencia detectada es el número de intervalos significativamente diferentes con los que se representa la intensidad de señal detectad. La presente invención permite la detección de señal con resolución que es mayor que la resolución nominal de la unidad de detección, incluyendo medios de detección eléctricos, registrando dos o más imágenes de la muestra donde sustancialmente solamente diferencias representadas en las dos o más imágenes es sensibilidad a la señal, preferentemente obtenida modificando el 45 tiempo de exposición y/o la amplificación eléctrica de la señal recogida, y combinando posteriormente las dos o más imágenes en una o más imagen de una manera que representa la imagen de la muestra con una mayor resolución de imagen que cada una de las dos o más imágenes recogidas. Por lo tanto, la resolución en las señales detectadas se potencia proporcionando diferente sensibilidad de señal en las al menos dos imágenes.

50 Un aspecto de la presente invención se refiere a un sistema para la valoración de partículas, donde la valoración comprende dos o más tareas individuales, donde las tareas se realizan de una manera predeterminada y donde la manera predeterminada comprende una serie de instrucciones. Preferentemente, las instrucciones pueden combinarse de manera flexible, permitiendo al sistema adaptarse para realizar dos o más tipos diferentes de valoración de partículas, donde la diferencia del tipo preferentemente refleja la diferencia de una propiedad tal como 55 sincronización, selección de longitud de onda de excitación o emisión.

Un aspecto de la presente invención se refiere al aparato que comprende procedimientos para almacenar imágenes recogidas junto con la identificación de la muestra que está siendo analizada y el procedimiento de funcionamiento del sistema de registro de imágenes. Las imágenes almacenadas pueden disponerse en una base de datos, lo que 60 permite la recuperación de los datos para la generación de informes y/o la selección de una o más imágenes

recogidas tomando como base una o más propiedades.

En aún otra realización de la invención, el dispositivo para muestras, que puede ser un cartucho de viales, del aparato descrito facilita la determinación de la viabilidad de suspensiones celulares a partir de una amplia gama de células cultivadas y primarias, midiendo recuentos celulares (totales y no viables) por volumen.

Con el fin de determinar la viabilidad de células, la muestra de la suspensión celular es arrastrada al interior del dispositivo para muestras presionando el émbolo. El interior del dispositivo para muestras está revestido con los colorantes fluorescentes naranja de acridina y 4,6-diamino-2-fenilindol (DAPI)/variación sustituida de DAPI a una concentración final de 2,5 µg/ml tanto para AO como para DAPI/variación sustituida de DAPI. El AO tiñe toda la población de células y DAPI/variación sustituida de DAPI las células no viables. El dispositivo para muestras se coloca en el aparato donde se determinan los recuentos y la viabilidad celulares.

La combinación de naranja de acridina y DAPI es adecuada para la determinación de la viabilidad de células y tejidos dado que los dos colorantes de ADN no muestran solapamiento espectral en ni ninguna circunstancia. En un procedimiento de análisis, las células en una suspensión se incuban con los dos colorantes fluorescentes. El naranja de acridina penetra en todas las células en la población, mientras que DAPI penetra solamente en células con membranas dañadas. Las células etiquetadas con DAPI se detectan mediante excitación UV y midiendo la luz azul, mientras que las células etiquetadas con naranja de acridina se detectan mediante excitación con luz azul y midiendo la luz verde emitida. De esta manera, puede obtenerse un recuento absoluto de células y porcentaje de viabilidad a partir de los datos. Adicionalmente, la detección de la luz roja emitida por la naranja de acridina puede dar información adicional acerca del estado, la viabilidad y la integridad de las células.

En otras realizaciones de la invención, también pueden usarse otros tintes de acridina tales como clorhidrato de 3,6-diaminoacridina, lactato de 6,9-diamino-2-etoxi-acridina, diclorhidrato de quinacrina, nitrato de bis-N-metilacridinio, bromuro de naranja de 10-dodecilacridina, diclorhidrato de mostaza de quinacrina, clorhidrato de acriflavina y triflato de 9-isotiocianato-10-metilacridinio y colorante 4,6-diamino-2-fenilindol (DAPI)/variación sustituida de DAPI a una concentración combinada de 2,5 µg/ml.

En aún otro aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento para detectar la viabilidad de una célula de ensayo usando el aparato de la descripción anterior. El procedimiento que comprende mezclar la célula de ensayo con colorante 4,6-diamino-2-fenilindol (DAPI)/o variación sustituida de DAPI; permitir la tinción de células durante un periodo de tiempo de, como máximo, 60 minutos, tal como 30 minutos, tal como 20 minutos, tal como, como máximo, 10 minutos; obtener una muestra de células teñidas, donde solamente se tiñen células no viables; exponer la célula de ensayo teñida a una luz de excitación; detectar una señal de fluorescencia proveniente de la célula de ensayo teñida; y procesar la señal de fluorescencia para identificar si la célula de ensayo es no viable.

En otra realización de la invención, la célula de ensayo también puede incluir una pluralidad de células. El recuento celular y la no viabilidad de la pluralidad de células se identifican usando colorante 4,6-diamino-2-fenilindol (DAPI)/o variación sustituida de DAPI. La célula de ensayo se selecciona de entre una célula cultivada y una célula primaria. La célula de ensayo se selecciona de entre una línea celular de mamífero, línea celular de mamífero en suspensión, línea celular de insecto, tal como Schneider-2 de *Drosophila melanogaster*, línea celular embrionaria humana, célula primaria y célula sanguínea humana. La célula de ensayo se prepara en un entorno controlado, tal como se indica como ejemplo en la sección de material y procedimiento en los ejemplos.

En aún otra realización de la invención, el colorante naranja de acridina se mezcla con colorante 4,6-diamino-2-fenilindol (DAPI)/variación sustituida de DAPI a una concentración combinada de 2,5 µg/ml. Un dispositivo para muestras en el que la muestra de ensayo se inyecta/se carga, se reviste con una combinación de el colorante AO y el colorante DAPI/variación sustituida de DAPI. El colorante naranja de acridina tiñe tanto la célula de ensayo viable como la célula de ensayo no viable.

En aún otra realización de la invención, las células de ensayo se inyectan/se cargan en el dispositivo para muestras usando un émbolo.

La luz de excitación es a partir de una fuente seleccionada de entre una fuente de luz térmica, tal como una lámpara halógena, o una lámpara de gas tal como una lámpara de xenón, un diodo emisor de luz, un láser o un diodo láser o cualquier otra fuente de luz tal como se describe en el aparato anterior.

La señal de fluorescencia se procesa analizando la señal de fluorescencia para un número de recuentos de células no viables en las células.

- Este procedimiento se realiza usando un aparato que etiqueta una célula de ensayo. El aparato comprende un dispositivo para muestras revestido al menos parcialmente con colorante 4,6-diamino-2-fenilindol (DAPI)/variación sustituida de DAPI, donde el DAPI/variación sustituida de DAPI tiñe solamente una célula no viable; una unidad de inyección de células de ensayo para cargar la célula de ensayo en el dispositivo para muestras; una unidad de excitación para exponer la célula de ensayo inyectada a una luz de excitación; una unidad de detección para detectar una señal de fluorescencia emitida desde la célula de ensayo cargada; y un procesador para procesar la señal de fluorescencia para valorar si el ensayo es no viable.
- 5
- 10 En aún otra realización de la invención, se proporciona un procedimiento para proporcionar información acerca de una célula usando el aparato de iluminación y el aparato de detección descritos anteriormente. El procedimiento comprende transfectar la célula con una proteína fluorescente o ácido nucleico etiquetado de forma fluorescente; añadir una molécula que reacciona con tiol a la célula transfectada para obtener una solución celular; exponer la solución celular a una luz de excitación; detectar una luz de emisión proveniente de la solución celular; y procesar la
- 15 luz de emisión para obtener la información acerca de la célula.

El procedimiento presentado en el presente documento usa proteínas fluorescentes o ácido nucleico etiquetado de forma fluorescente en combinación con una molécula que reacciona con tiol, tal como maleimidas (por ejemplo DACM) y un tinte de ADN incapaz de penetrar en las células (por ejemplo yoduro de propidio) para monitorizar la

20 eficacia de transfección y al mismo tiempo proporcionar información acerca de la viabilidad de la población celular y los niveles de citotoxicidad.

La información habitualmente incluye eficacia de transfección, viabilidad celular y nivel de citotoxicidad, es decir detectar células no viables.

25

La célula se selecciona de entre una célula cultivada y una célula primaria. La célula se selecciona de entre una línea celular de mamífero, línea celular de mamífero en suspensión, línea celular de insecto, tal como Schneider-2 de *Drosophila melanogaster*, línea celular embrionaria humana, célula primaria y célula sanguínea humana.

30 El procedimiento comprende además mezclar un tinte de ADN incapaz de penetrar en las células. El tinte de ADN incapaz de penetrar en las células puede ser yoduro de propidio, y homodímero de acridina. El ácido nucleico se selecciona de entre una proteína fluorescente y un ARN de interferencia pequeño. La molécula que reacciona con tiol es una maleimida, tal como DACM.

35 En otra realización de la invención, la célula incluye una pluralidad de células. Además, la información acerca de la pluralidad de células se identifica usando una combinación de una proteína fluorescente o ácido nucleico etiquetado de forma fluorescente y una molécula que reacciona con tiol.

La luz de excitación proviene de una fuente seleccionada de entre una fuente de luz térmica, tal como una lámpara halógena, o una lámpara de gas tal como una lámpara de xenón, un diodo emisor de luz, un láser o un diodo láser o cualquier otra fuente de luz descrita en las secciones anteriores.

40

En varias realizaciones de la presente invención, la luz de excitación es una luz verde y la luz de emisión es una luz roja para determinar una célula no viable, cuando se usa yoduro de propidio como tinte de ADN incapaz de penetrar

45 en las células; y la luz de excitación es una luz azul y la luz de emisión es una luz verde para determinar una célula no viable, cuando se usa homodímero de acridina como un tinte de ADN incapaz de penetrar en las células.

En varias realizaciones de la presente invención, la célula que expresa BFP emite una luz azul cuando se excita con una UV o luz ultravioleta; la célula que expresa CFP emite una luz cian cuando se excita con una luz violeta o azul;

50 la célula que expresa GFP emite una luz verde cuando se excita con una luz azul; la célula que expresa YFP emite una luz amarilla cuando se excita con una luz azul o verde; la célula que expresa dsRed o variantes de éste emite una luz roja cuando se excita con una luz verde; la célula que aloja siRNA emite una luz azul cuando se excita con una UV o luz ultravioleta; la célula que aloja siRNA emite una luz cian cuando se excita con una luz violeta o azul; la célula que aloja siRNA emite una luz verde cuando se excita con una luz azul; la célula que aloja siRNA emite una

55 luz amarilla cuando se excita con una luz azul o verde; y la célula que aloja siRNA emite una luz roja cuando se excita con una luz verde.

La detección comprende recibir la luz de emisión en al menos un detector y el procesamiento comprende analizar la luz de emisión para determinar la eficacia de transfección, la viabilidad celular y el nivel de citotoxicidad.

60

El procedimiento anterior se implementa usando un aparato, que se usa para determinar información acerca de una célula. El aparato incluye una unidad de transfección para transfectar la célula con una proteína fluorescente o ácido nucleico etiquetado de forma fluorescente; una unidad de mezcla para añadir una molécula que reacciona con tiol a la célula transfectada para obtener una solución celular; una unidad de excitación para exponer la solución celular a una luz de excitación; una unidad de detección para detectar una luz de emisión proveniente de la solución celular; y un procesador para procesar la luz de emisión para obtener la información acerca de la célula.

El aparato y procedimiento de la presente invención se usó para analizar partículas en una muestra. La invención proporciona un dispositivo sencillo, rápido y flexible para analizar células a bajo aumento, en lo sucesivo caracterizar células, detectar células, contar células así como determinar la viabilidad, motilidad, actividad metabólica, cuantificación de metabolitos, división celular, proliferación, salud, nivel de estrés, apoptosis, necrosis, otro estado, o morfología de células. Varios ejemplos de dichos análisis se presentan a continuación para una mejor comprensión de la presente invención:

15 Ejemplo 1

Enfoque de luz de iluminación usando un aparato tradicional (consúltase la figura 1)

La figura 1A muestra una fuente de luz imaginaria, que muestra una estructura sustancial en sus elementos emisores de luz (101), que comprende 4 regiones cuadradas que emiten luz de forma uniforme, separados y rodeados por elementos pasivos (102), que emiten luz no detectable. La fuente de luz mide 1 x 1 mm, y la emisión angular es de +40 a -40 grados.

La figura 1B muestra una disposición, que simula el uso de una fuente de luz (103, idéntica al artículo 101) para la iluminación de un material de muestra. La figura muestra una Lente esférica biconvexa (104), que tiene una longitud focal $f = 8,5$ mm y un diámetro $D = 12$ mm (una de este tipo está disponible de Melles Griot LAG000). Además, el sistema comprende un elemento de filtro (105) normalmente usado en análisis de fluorescencia para la eliminación de luz a longitudes de onda donde se espera emisión. Finalmente el sistema comprende una lente convexa plana (106), que tiene una longitud focal $f = 12$ mm y un diámetro $D = 12$ mm (una de este tipo está disponible en Edmund Optics, nº de pieza 45084) y finalmente el material de muestra (107) que se va a iluminar.

La figura 1B muestra un número de rayos seleccionados aleatoriamente e ilustra la trayectoria de estos rayos por todo el sistema.

La figura 1C muestra una imagen simulada de la fuente de luz, tal como aparecería en el material de muestra. La figura 1C muestra una fuerte similitud con la fuente de luz ilustrada en la figura 1A, donde la estructura de emitancia se identifica fácilmente. Si se desea la supresión o eliminación de la estructura, se vuelve necesario usar un medio de difusión, por ejemplo usando un difusor. Esto afectaría al tamaño de la imagen y causaría "borrosidad" dando como resultado ensanchamiento de la iluminación y, de este modo, pérdida de luz efectiva y/o homogeneidad reducida de la luz de iluminación.

Ejemplo 2

Enfoque de luz de iluminación mediante agrupación ordenada de microlentes (consúltase la figura 2)

La figura 2A muestra una disposición, que simula la iluminación de un material de muestra, similar al sistema en el ejemplo 1, con la adición de una agrupación ordenada de microlentes (206). El sistema contiene una fuente de luz (201) idéntica a aquella en la figura 1A, lente esférica biconvexa (202), un elemento de filtro (203), una lente convexa plana (204) y finalmente el material de muestra a iluminar (205).

La agrupación ordenada de microlentes (206) es de 12 mm de diámetro, y el cuadrado circunscrito (12 por 12 mm) se divide en elementos de lente biconvexa simétrica adyacentes rectangulares de 60 x 44 con un grosor de 1,191 mm y radios de lente de 0,4 mm y -0,4 mm respectivamente, cada elemento de lente individual está generando una pequeña imagen de la fuente de luz y cuando todas las imágenes individuales se superponen en la muestra, una forma rectangular con iluminación homogénea está presente.

El sistema se sometió a una simulación idéntica a aquella en el ejemplo 1 y el resultado se ilustra en la figura 2B, que muestra la iluminación del material de muestra. La figura 2B muestra que la estructura de la fuente de luz se elimina sustancialmente, sustancialmente sin pérdida de eficacia de iluminación debido al ensanchamiento de la iluminación. Estas propiedades se prefieren altamente cuando se realizan análisis fotoluminiscentes, tales como

análisis de fluorescencia.

Ejemplo 3

5 Comparación de la iluminación (consúltese la figura 3)

La figura 3 muestra un gráfico, que ilustra la diferencia de iluminación sencilla e iluminación de acuerdo con la presente invención, cuando se usa una fuente de luz que tiene una estructura de iluminación sustancial. La comparación se basa en los resultados de los ejemplos 1 y 2, tal como se ha descrito anteriormente.

10

El gráfico en la figura 3 muestra la intensidad de la iluminación tal como se descubre en los ejemplos 1 y 2 y se indica en la figura 1C y 2B, a lo largo de una línea horizontal indicada mediante las flechas en las figuras.

15

La iluminación tal como se encuentra en el ejemplo 1 se representa mediante la línea 301, mientras que la iluminación tal como se encuentra en el ejemplo 2 se representa mediante la línea 302. Las líneas 303 representan los límites de la iluminación tal como se define mediante aumento del sistema óptico.

20

El gráfico ilustra que la línea 302 tiene menos extensión fuera de los límites 303 que la línea 301, lo que dará mayor eficacia de iluminación. Además, la variación en la línea 302 dentro de los límites 303 es considerablemente menor que la variación en la línea 301, tanto con respecto a la estructura en la emitancia de la fuente de luz, presente como una caída significativa en la iluminación en el centro y como un descenso significativo de la intensidad hacia los bordes de los límites.

Ejemplo 4

25

Implementación de acuerdo con la presente invención (consúltese la figura 4)

30

La figura 4 muestra una implementación de acuerdo con la presente invención. Ilustra un sistema óptico, que comprende una fuente de luz (401), por ejemplo ML101J17-01 (Mitsubishi, Japón), LZ1-00xx05 o LZ1-00xx03 (LedEngin, EE. UU.), específicamente la selección de la fuente de luz depende de la región y la intensidad de longitud de onda deseadas. Además comprende una lente de colimación (402), por ejemplo LAG000 (Melles Griot, EE. UU.), una agrupación ordenada de microlentes (403), por ejemplo elemento de agrupación ordenada de lentes de doble cara, un medio de filtro espectral (404), normalmente filtros de interferencia y/o de absorción, en análisis de fluorescencia el filtro se denomina filtro de excitación, y finalmente un componente de enfoque (405), por ejemplo una lente PCX o DCX con longitud focal efectiva de entre 2 y 20 mm, donde el efecto de cambiar la longitud focal afecta al tamaño de la región iluminada por la fuente de luz. Finalmente, la ilustración muestra el plano de iluminación (406), sobre el que se desea proyectar una luz relativamente homogénea proveniente de la fuente de luz, por ejemplo la región de iluminación, preferentemente con eficacia de iluminación relativamente elevada.

40

La figura 4B muestra la implementación de acuerdo con la presente invención, donde se dibujan rayos de luz simulados, demostrando el funcionamiento óptico del sistema.

Ejemplo 5

45 Adaptación de la región de iluminación (consúltese la figura 5)

La figura 5 muestra la iluminación de medios de iluminación de acuerdo con la presente invención. La diferencia entre las figuras 5A y 5B muestra el efecto de reducir la longitud focal del elemento de enfoque (405 en la figura 4), afectando, de este modo, al tamaño efectivo de la región de iluminación.

50

Ejemplo 6

Elemento de microlentes (consúltese la figura 6)

55

La figura 6 muestra un elemento de agrupación ordenada de microlentes de acuerdo con la presente invención. El elemento mostrado en la figura 6A es un artículo de plástico térmico, que comprende medios para disponer y fijar el elemento (601), en este caso en forma de un reborde, y dos agrupaciones ordenadas de microlentes (602), de las cuales no se muestra la agrupación ordenada de la parte inferior.

60

Cada una de las agrupaciones ordenadas de microlentes consiste en un número de lentes de 1,2 x 0,9 mm de 1,7

mm de radio, separadas por aproximadamente 5 mm, que es el grosor del elemento de microlente. El patrón de las microlentes, mostradas en la figura 6B, es una rejilla de 13 por 9, que se ha conformado de forma aproximada de manera circular, preferentemente similar a la forma del haz de luz, para reducir el tamaño físico, retirando 5 lentes de cada esquina.

5

Ejemplo 7

Disposición del módulo óptico (consúltese la figura 7)

10 Una realización típica de acuerdo con la presente invención incluye dos o más módulos ópticos y la figura 7 muestra la disposición de estos módulos. Los módulos son el módulo de iluminación (701), muestra o compartimento para muestras (702), módulo de detección (703) y un espejo óptico (704).

La figura 7A muestra una realización preferida que comprende un módulo de iluminación, para muestras y de
15 detección, donde todos los módulos se disponen en ejes paralelos unos con respecto a otros. El módulo de iluminación, que normalmente comprende una fuente de luz, componente óptico de enfoque y medios de separación de longitudes de onda (estos artículos no mostrados en la figura), ilumina luz sobre el compartimento para muestras, donde la muestra normalmente se dispone en una orientación perpendicular con respecto a los ejes principales de luz emitida desde el módulo de modulación. Normalmente, señales provenientes del compartimento para muestras
20 son emitidas en todas direcciones pero una fracción de estas señales son recogidas por el módulo de detección, que, en esta disposición, está en, o sustancialmente en, los mismos ejes que el módulo de iluminación y el compartimento para muestras.

La figura 7B muestra otra realización igualmente preferida de la presente invención, donde señales provenientes del
25 compartimento para muestras son dirigidas hacia el módulo de detección por un espejo óptico. Esta realización permite que el módulo de detección esté situado fuera de los ejes formados entre los módulos de iluminación y el compartimento para muestras, tal como se ilustra en la figura 7B, donde el módulo detector está en una disposición perpendicular.

30 Dado que la figura 7 solamente muestra la orientación general de los diferentes módulos, y no la posición de diferentes elementos, es obvio para un experto en la materia, que cuando se incluye un espejo óptico para dirigir la luz fuera del eje óptico, a menudo puede ser ventajoso incluir un componente óptico del módulo de detección, tal como una o más lentes entre el módulo de compartimento para muestras y el espejo óptico. Normalmente el efecto de dicha disposición sería garantizar una naturaleza más paralela de la luz emitida desde el compartimento para
35 muestras, detectada en el módulo de detección, que puede hacer más homogénea la reacción de la luz a una propiedad dependiente de la longitud de onda, tal como filtración, y/o para aumentar la apertura efectiva del módulo de detección, colocando un componente óptico de recogida cerca de la imagen.

Realizaciones de la presente invención incluyen dos o más módulos de detección, por ejemplo combinando la
40 disposición mostrada en la figura 7A y B. Esto se realiza normalmente incluyendo un espejo óptico con propiedades de reflectancia dependientes de la longitud de onda, de modo que las propiedades de reflectancia/transmitancia sean sustancialmente diferentes para diferentes longitudes de onda. Dichas realizaciones permiten la detección simultánea de dos o más propiedades ópticas de la muestra en el módulo de compartimento para muestras.

45 Ejemplo 8

Recuento celular y viabilidad de células en suspensión; células Jurkat (JM) (una línea celular de linfocitos T) (consúltese las figuras 8, 9 y 10)

50 Materiales y procedimientos. Se cultivaron células Jurkat (JM) a 37°C en una atmósfera de aire humidificada con CO₂ al 5% en RPMI (Invitrogen, #61870) suplementado con suero fetal bovino inactivado por calor al 10% (Invitrogen, #10108-165). La viabilidad al 98% de células Jurkat (densidad celular 1,4×10⁶, se determinó usando el aparato cargado en un dispositivo para muestras, que contenía los tintes fluorescentes naranja de acridina (AO) y 4,6-diamino-2-fenilindol (DAPI). El dispositivo para muestras se colocó en el aparato y las células se contaron e
55 investigaron usando el aparato. Para mostrar que DAPI funciona para teñir células muertas y células muertas solamente, se usó la tinción de células con yoduro de propidio (PI) junto con DAPI. El PI es incapaz de penetrar en la membrana y, por lo tanto, es excluido de las células viables. Las células teñidas también se investigaron usando un microscopio fluorescente Olympus IX50. Las imágenes se capturaron usando una cámara Lumenera CCD y software de desarrollo propio. La fluorescencia de DAPI se detectó usando un cubo de filtros U-MNUA2 (paso de banda UV,
60 330-385 nm) (Olympus) y la fluorescencia de PI se detectó usando un cubo de filtros U-MWG2 (paso largo verde)

(Olympus).

Resultados. Tanto AO como DAPI tiñen las células Jurkat inmediatamente, tiñendo toda la población y las células no viables, respectivamente, con lo que la viabilidad de la población celular puede determinarse. Tinción doble usando DAPI y PI mostró que estos tenían las mismas células, confirmando de este modo que DAPI puede usarse como tinte para células no viables. Sin embargo, se observó que durante la incubación (más de 15 minutos) DAPI también teñía una parte de la población negativa para PI. Además, observando las células en contraste de fases y en un filtro de UV en el microscopio fluorescente, que detecta las células teñidas con DAPI, quedó claro que las células que aparecían muertas en contraste de fases también se descubrió que era positivas para DAPI y, por lo tanto, muertas.

Ejemplo 9

Recuento celular y viabilidad de células adherentes; células HEK293 (una línea celular de riñón embrionario humano) (consúltase la figura 8A)

Materiales y procedimientos. Se cultivaron células HEK293 a 37°C en una atmósfera de aire humidificada con CO₂ al 5% en DMEM (Invitrogen, #31966) suplementado con suero fetal bovino inactivado por calor al 10% (Invitrogen, #10108-165). Al 50% de confluencia las células se recogieron con 0,5 ml de tripsina (Invitrogen, #25300) y se neutralizaron con 5 ml de medio (DMEM + FCS al 10%). Las células se cargaron en un dispositivo para muestras, que contenía los tintes fluorescentes naranja de acridina (AO) y 4,6-diamino-2-fenilindol (DAPI), y el cartucho se colocó en el aparato. Las células se contaron e investigaron usando el aparato y software de desarrollo propio.

Resultados. Como para las células Jurkat, las células HEK293 se tiñeron inmediatamente con AO y DAPI, tiñendo toda la población y las células no viables, respectivamente, determinando de este modo la viabilidad de la población celular.

Ejemplo 10

Recuento celular y viabilidad de líneas celulares de insecto; líneas celulares S2 y Sf9 (consúltase la figura 8A)

Células de la línea Schneider-2 (S2) de *Drosophila melanogaster* se derivaron originalmente de embriones de *Drosophila* en fase embrionaria tardía, y la línea celular Sf9 se derivó originalmente de tejido ovárico pupal de la oruga militar otoñal *Spodoptera frugiperda*.

Materiales y procedimientos. Se cultivaron células S2 y Sf9 a 28°C sin agitación en medio para *Drosophila* de Schneider (Invitrogen, #21720) y medio para insecto de Grace (Invitrogen, # 11605), respectivamente, suplementados con suero fetal bovino inactivado por calor al 10% (Invitrogen, #10108-165). Las células se cargaron en un dispositivo para muestras, que se colocó en el aparato. Las células se contaron e investigaron usando el aparato.

Resultados. Como era el caso para la suspensión y las líneas celulares adherentes, las líneas celulares de insecto también se tiñeron inmediatamente con AO and DAPI en el cartucho Via1-Cassette, mostrando que el cartucho Via1-Cassette también puede usarse para medir la viabilidad en células de insecto.

Ejemplo 11

Recuento celular y viabilidad de células primarias; esplenocitos murinos, células de médula ósea murina y células sanguíneas humanas (consúltase la figura 11)

Materiales y procedimientos: El bazo de un ratón C57BL/6 se colocó en PBS enfriado con hielo y se trituró suavemente usando el extremo de una jeringa estéril. La suspensión se centrifugó a 300 g durante 10 minutos; el sedimento se resuspendió en 1 ml de NH₄Cl al 0,83% para lisar eritrocitos y se incubó durante 3 minutos en hielo. A las células se les añadieron a continuación 14 ml de PBS y se centrifugaron a 300 g durante 10 minutos. Los esplenocitos se resuspendieron en RPMI (Invitrogen, #61870) suplementado con suero fetal bovino inactivado por calor al 10% (Invitrogen, #10108-165), 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina (Invitrogen, #15140-122). Las aglutinaciones celulares se dejaron sedimentar y se retiraron pipeteando, y la suspensión de células individuales resultante se usó para análisis.

Las células de médula ósea se recogieron de forma aséptica en la campana de flujo laminar. Tibia y fémur

bilaterales se extirparon asépticamente, se liberaron del tejido blando circundante, y se colocaron en una placa de Petri con 10 ml de etanol al 70%. Después de 2 minutos, se transfirieron a PBS enfriado con hielo. La cavidad de la médula ósea se lavó a continuación con 5 ml de PBS frío usando una jeringa de 5 ml con una aguja de calibre 27 unida, y las células se recogieron de cada hueso. Las células se centrifugaron a 300 g durante 10 min, el sobrenadante se desechó, y las células se lavaron dos veces. Después del segundo lavado, el sedimento celular se resuspendió en RPMI 1640 (Invitrogen, #61870) suplementado con suero fetal bovino inactivado por calor al 10% (Invitrogen, #10108-165), 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina (Invitrogen, #15140-122).

Una pequeña muestra de sangre venosa humana se extrajo de la yema de un dedo mediante el uso de una aguja. La muestra de sangre se diluyó 5 veces en PBS antes del análisis.

Una muestra de cada una de las células primarias (esplenocitos murinos, células de médula ósea murina y células sanguíneas humanas) se cargó en el dispositivo para muestras y se analizó en el aparato.

15 Resultados. Como era el caso para la suspensión, líneas celulares adherentes y de insecto, las células primarias (esplenocitos murinos, células de médula ósea murina y células sanguíneas humanas) también se tiñeron inmediatamente con AO y DAPI en el cartucho Via1-Cassette, tiñendo toda la población y la población muerta de células, respectivamente. Esto muestra que el cartucho Via1-Cassette también puede usarse para medir la viabilidad en células primarias.

20 Ejemplo 12

Eficacia de transfección y recuento celular de células que expresan RFP usando DACM. (Consúltese la figura 12)

HEK293 es una línea celular de riñón embrionario humano que, en este ejemplo, ha sido transfectada con una RFP (mRFP1 derivada de dsRed) fusionada al promotor de CMV; EC41. Usando DACM para teñir todas las células viables y RFP para detectar células transfectadas, la relación de células viables transfectadas respecto a todas las células (la eficacia de transfección) puede determinarse fácilmente.

30 Materiales y procedimientos. Células HEK293 se cultivaron a 37°C en una atmósfera de aire humidificada con CO₂ al 5% en RPMI (Invitrogen, #61870) suplementado con suero fetal bovino inactivado por calor al 10% (**Invitrogen, #10108-165**). A 190 µl de una mezcla de células HEK293 EC41 transfectadas y sin transfectar se les añadieron 10 µl de DACM (N-(7-dimetilamino-4-metil-3-coumarinil)-maleimida, WAKO Pure Chemical Industries, n.º CAS 55145-14-7) disuelto en DMSO (200 µg de DACM por ml de DMSO) y se mezclaron pipeteando. Las células se cargaron en un cartucho NucleoCassette (que no contenía yoduro de propidio u otros tintes). El cartucho NucleoCassette se colocó en el aparato y las células se contaron e investigaron usando el aparato.

40 Resultados. Se determinó que la concentración de todas las células viables (basándose en las células teñidas por DACM, figura 5) era $2,4 \times 10^6$ células por ml. Se determinó que la concentración de células que expresan RFP era $1,7 \times 10^6$ células por ml y se descubrió, por lo tanto, que la eficacia de transfección era del 71,5%.

45 Conclusión. Sondas que reaccionan con tiol tales como DACM pueden usarse en ensayos para determinar la eficacia de transfección cuando la transfección implica proteínas fluorescentes.

45 Ejemplo 13

Eficacia de transfección, recuento celular y viabilidad de células que expresan GFP usando DACM y PI (consúltese la figura 13 y la figura 14)

MCF-7 es una línea celular de cáncer de mama que, en este ejemplo, ha sido transfectada con una GFP fusionada al promotor de CMV. Usando yoduro de propidio (PI) para teñir células no viables, DACM para teñir todas las células viables y GFP para detectar células transfectadas, la eficacia de transfección, la viabilidad celular y el recuento celular pueden determinarse fácilmente.

55 Materiales y procedimientos. Células MCF-7 que expresan de forma estable GFP (MCF-7 EC3) se cultivaron a 37°C en una atmósfera de aire humidificada con CO₂ al 5% en RPMI (Invitrogen, #61870) suplementado con suero fetal bovino inactivado por calor al 10% (Invitrogen, #10108-165). A 190 µl de células MCF-7 EC3 se les añadieron 10 µl de DACM (N-(7-dimetilamino-4-metil-3-coumarinil)-maleimida, WAKO Pure Chemical Industries, n.º CAS 55145-14-7) disuelto en DMSO (200 µg de DACM por ml de DMSO) y se mezclaron pipeteando. Las células se cargaron en un

NucleoCassette que contenía el tinte de ADN yoduro de propidio (PI). El PI es incapaz de penetrar en la membrana y está excluido, por lo tanto, de células viables. El NucleoCassette se colocó en el aparato y las células se contaron e investigaron usando el aparato. Las células también se investigaron usando un microscopio fluorescente Olympus IX50, y las imágenes se capturaron usando una cámara Lumenera CCD y software de desarrollo propio. Las fluorescencias de PI, DACM y GFP se detectaron usando, respectivamente, cubos de filtros U-MWG2 (paso largo verde: 510-550 nm), U-MNUA2 (paso de banda UV, 330-385 nm) y (paso largo azul) (Olympus).

Resultados. Una fracción baja de las células se tiñeron mediante PI (figura 6A) y el aparato determinó que la concentración de células no viables era de $1,2 \times 10^5$ células por ml. Se determinó que la concentración de células viables (las células teñidas mediante DACM, figura 6B) era $2,7 \times 10^6$ células por ml. Basándose en esto, se descubrió que la viabilidad de las células en la muestra era del 95,6%. Se determinó que la concentración de células que expresan GFP era de $2,6 \times 10^6$ células por ml y se descubrió, por lo tanto, que la eficacia de transfección era del 96%.

Una mezcla de células MCF-7 transfectadas y sin transfectar también se investigó usando un microscopio fluorescente (figura 7). La figura consiste en una superposición de imágenes de las mismas células capturadas usando diferentes cubos de filtros para la detección de DACM (paso de banda UV), GFP (paso de banda azul) and PI (paso largo verde). Tal como puede verse a partir de la figura, DACM tiñe células viables incluyendo las células que expresan GFP, mientras que las células muertas son teñidas solamente por PI.

Conclusión. Pueden usarse sondas que reaccionan con tiorales tales como DACM en un ensayo para determinar la eficacia de transfección y combinarse con un tinte incapaz de penetrar tal como PI, también puede obtenerse información acerca de la viabilidad de las células investigadas.

Ejemplo 14

Quantificación del contenido de ADN usando DAPI o yoduro de propidio (PI) en células de mamífero (consúltese la figura 15 y la figura 16)

La intensidad de fluorescencia integrada sobre una célula teñida con DAPI está en relación estequiométrica con el contenido de ADN. DAPI se une preferentemente a ADN bicatenario y el rendimiento cuántico de complejos de DAPI/ARN es solamente el 20% de aquel del complejo de DAPI/ADN. Por lo tanto, usando DAPI, no hay necesidad de retirar ARN mediante tratamiento con ARNasa antes de las mediciones del contenido de ADN. Este es un prerrequisito para otros colorantes usados comúnmente para mediciones del contenido de ADN celular, tales como yoduro de propidio. El DAPI interactúa con ADN bicatenario mediante asociación con agrupaciones de AT en el surco menor. Cuando está unido a ADN bicatenario, su máximo de absorción está en 358 nm y su máximo de emisión está en 461 nm. La unión de DAPI a ADN produce una potenciación de fluorescencia de 20 veces.

En el ejemplo, el contenido de ADN de una línea celular adherente, MCF-7, una línea celular en suspensión, JM (una línea celular derivada de Jurkat), se midió usando DAPI o yoduro de propidio como tinte de ADN.

Materiales y procedimientos. Se cultivaron células MCF-7 en RPMI + FCS al 10% al 80-90% de confluencia y las células se lavaron una vez en PBS, se tripsinizaron y se recogieron por centrifugado antes de la fijación con etanol. Se cultivaron células JM en RPMI + FCS al 10% a una densidad de $5,0 \times 10^5$ células/ml. Las células se recogieron por centrifugado y se lavaron una vez en PBS antes de la fijación con etanol. Las células MCF-7 y JM se resuspendieron minuciosamente en 0,5 ml de PBS y las suspensiones celulares se añadieron, cada una, a 4,5 ml de fijador etanol al 70% enfriado con hielo. Las células se mantuvieron en fijador durante al menos dos horas antes de teñir con DAPI o PI.

Para tinción con PI. Las células se recogieron por centrifugado durante 5 min a $200 \times g$ y se lavaron una vez con PBS. Después de otro centrifugado, las células se resuspendieron en solución de tinción de yoduro de propidio (a 100 ml de Triton X-100 al 0,1% (v/v) en PBS se le añaden 20 mg de ARNasa A libre de ADNasa y 2 mg de yoduro de propidio) y se incubaron durante 30 minutos a 37°C antes del análisis mediante citometría de flujo y el aparato reivindicado.

Para tinción con DAPI. Las células se recogieron por centrifugado durante 5 min a $200 \times g$ y se lavaron una vez con PBS. Después de otro centrifugado, las células se resuspendieron en solución de tinción de DAPI (A 100 ml de Triton X-100 al 0,1% (v/v) en PBS añadir 0,1 mg de 4',6-diamidino-2-fenilindol; DAPI) y se analizaron directamente mediante el aparato reivindicado.

Resultados. Células MCF-7 tratadas con ARNasa A y teñidas con PI se analizaron mediante el aparato reivindicado

y citometría de flujo estándar. Tal como se muestra en la figura 15, el aparato reivindicado proporciona datos exactos y precisos sobre el contenido de ADN celular que son comparables con los obtenidos mediante citometría de flujo, cuyo procedimiento es el usado más comúnmente para la cuantificación de ADN. A continuación, células MCF-7 del mismo cultivo se tiñeron directamente con DAPI (sin tratamiento con ARNasa A) y se analizaron usando el aparato reivindicado. Tal como se muestra en la figura 16, el histograma del contenido de ADN obtenido de, respectivamente, células teñidas con PI y DAPI son casi idénticos. Por lo tanto, el aparato reivindicado permite la cuantificación de ADN celular usando tinción tanto con PI como con DAPI.

Ejemplo 15

10

Efectos de fármacos sobre el contenido de ADN en células de mamífero (consúltese la figura 17)

El contenido de ADN de células JM tratadas con diferentes fármacos se midió usando yoduro de propidio como tinte de ADN.

15

Materiales y procedimientos. Se cultivaron células JM en RPMI + FCS al 10% a una densidad de $4,7 \times 10^5$ células/ml y se privaron de suero o se trataron con los siguientes fármacos durante 20 horas:

1. Nocodazol (parada de G₂-M): 0,5 μ M
- 20 2. L-mimosina (G1): 0,5 mM
3. Hidroxiurea, HU (S): 2 mM
4. Camptotecina, CPT (S): 5 μ M
5. Etopósido (S): 20 μ M
6. Control no tratado

25

Las células se recogieron por centrifugado y se lavaron una vez en PBS antes de la fijación con etanol. Las células se resuspendieron minuciosamente en 0,5 ml de PBS y las suspensiones celulares se añadieron, cada una, a 4,5 ml de fijador etanol al 70% enfriado con hielo. Las células se mantuvieron en fijador durante al menos dos horas antes de teñir con PI.

30

Para tinción con PI. Las células se recogieron por centrifugado durante 5 min a 200 \times g y se lavaron una vez con PBS. Después de otro centrifugado, las células se resuspendieron en solución de tinción de yoduro de propidio (A 100 ml de Triton X-100 al 0,1% (v/v) en PBS se la añaden 20 mg de ARNasa A libre de ADN-asa y 2 mg de yoduro de propidio) y se incubaron durante 30 minutos a 37°C antes del análisis mediante citometría de flujo y el aparato reivindicado.

35

Resultados. Células JM tratadas con fármacos que afectan a diferentes fases del ciclo celular se analizaron mediante el aparato reivindicado y citometría de flujo estándar. Tal como se muestra en la figura 17, el aparato reivindicado proporciona datos exactos y precisos sobre el contenido de ADN celular que son comparables con los obtenidos de citometría de flujo. Por lo tanto, el aparato reivindicado permite la cuantificación de ADN celular y puede usarse para evaluar los efectos de diferentes fármacos sobre el ciclo celular.

40

Ejemplo 16

45 Cuantificación del contenido de ADN usando yoduro de propidio en células de levadura (consúltese la figura 18)

El contenido de ADN de células de levadura (*Schizosaccharomyces pombe*) se midió usando yoduro de propidio como tinte de ADN. Se usaron las siguientes dos cepas:

50

1. Eg544 (CM-SP4), $h^- \Delta mat2,3$
2. Eg816 (CM-SP7), $h^- cdc25-22 leu1-32$
3. Eg892 (CM-SP27), $h^+ cdc10-V50 ura4-D18$

55 Se cultivaron células *Cdc* (Eg816 y Eg892) a una densidad de 5×10^6 células/ml en medio EMM a 25°C y a continuación se incubaron a 36°C (temperatura restrictiva de mutantes de *cdc*) durante 4 horas antes de la recogida y la fijación en etanol al 70%. Se incubaron células *Cdc10* a temperatura restrictiva tanto en presencia como en ausencia de nitrógeno (EMM-N).

60 Se cultivaron células de tipo silvestre (Eg544) a una densidad de 5×10^6 células/ml en medio EMM a 30°C, a

continuación se cambiaron a EMM y EMM-N (privación de nitrógeno) y se incubaron a 30°C durante 3 horas antes de la recogida y la fijación en etanol al 70%.

El punto de detención esperado de diversos mutantes de cdc a temperatura restrictiva y de células privadas de nitrógeno:

1. Cdc10-V50 = detención en G₁: células cdc10-V50 cultivadas a la temperatura restrictiva se detendrán en G₁ con un contenido de ADN 1C. El alelo cdc10-V50 es permeable y una minoría de las células en la población aún se estará dividiendo. Para conseguir una completa detención en G₁ las células cdc10-V50 tienen que ser privadas de nitrógeno.
2. Cdc25-22 = detención en G₂ = células Cdc25-22 cultivadas a la temperatura restrictiva se detendrán en G₂ con un contenido de ADN 2C.
3. Células privadas de nitrógeno = detención en G₁
4. Células de tipo silvestre que crecen de forma vegetativa (Eg544) pasan la mayor parte del tiempo en la fase G₂ del ciclo celular y, por lo tanto, la mayoría de las células en la población tendrá un contenido de ADN 2C. Tras la privación de nitrógeno, las células de tipo silvestre se detendrán en G₁ con un contenido de ADN 1C. Una G₁ completa requiere numerosas horas de privación. En este experimento, las células son privadas solamente durante 3 horas y, por lo tanto, solamente unas pocas células se detendrán en G₁ con un contenido de ADN 1C.

20 Análisis del contenido de ADN. Aproximadamente 3 x 10⁶ células fijadas con etanol se trataron con ARNasa (0,1 mg/ml de ARNasa A en citrato sódico 50 mM, pH 7,0 durante una noche a 37°C), se tiñeron con yoduro de propidio (4 µg/ml de PI en citrato sódico 50 mM, pH 7,0), se sonicaron durante 10 segundos y se analizaron mediante citometría de flujo (10.000 células se contaron usando un FACSCalibur de Becton-Dickinson) y el aparato reivindicado.

25 Resultados. Células de levadura detenidas en diferentes fases del ciclo celular se analizaron mediante el aparato reivindicado y citometría de flujo estándar. Tal como se muestra en la figura 18 el aparato reivindicado proporciona datos exactos y precisos sobre el contenido de ADN celular que son comparables con los obtenidos mediante la citometría de flujo. Por lo tanto, el aparato reivindicado permite la cuantificación del contenido de ADN en células de levadura y puede usarse para estudiar por ejemplo la regulación del ciclo celular.

Ejemplo 17

Ensayos de apoptosis anexina V (consúltese la figura 19 y la figura 20)

35 Un ensayo para la detección de la apoptosis temprana se basa en el hecho de que la fosfatidilserina (PS) en células sanas, no apoptóticas, está localizada predominantemente en el estrato interno de la membrana plasmática que mira al citosol. Al principio del proceso apoptótico mientras la membrana celular todavía está intacta, la PS se transloca a la capa externa de la membrana. Las anexinas son un grupo de proteínas celulares que se unen a los fosfolípidos de una manera dependiente del calcio, y un miembro de este grupo; La anexina V ha demostrado ser una herramienta útil en la detección de células apoptóticas, ya que se une a los fosfolípidos cargados negativamente como PS y muestra una unión mínima a fosfatidilcolina y esfingomielina.

45 Al conjugar una etiqueta fluorescente con anexina V, es posible identificar y cuantificar las células apoptóticas. La anexina V también se unirá a PS en células apoptóticas tardías y necróticas pero, dado que se ha perdido la integridad de la membrana en estas células, éstas pueden distinguirse de las células apoptóticas tempranas por el uso de un colorante incapaz de penetrar tal como PI o DAPI.

50 En este caso, el aparato reivindicado se usa en el ensayo de anexina V etiquetada de forma fluorescente para teñir células apoptóticas y necróticas y PI para distinguir entre las células apoptóticas/necróticas tempranas y tardías.

Materiales y procedimientos. Células Jurkat (JM) se cultivaron a 37°C en una atmósfera de aire humidificada con CO₂ al 5% en RPMI (Invitrogen, N.º de Cat. 61870) suplementado con suero fetal bovino inactivado por calor al 10% (Invitrogen, N.º de Cat. 10108-165). Se añadieron 3 µM de camptotecina (Sigma, N.º de Cat. C-9911) a las células con el fin de inducir la apoptosis. Después de tres horas de incubación (37°C, CO₂ al 5%) las células se recogieron en solución salina tamponada con fosfato fría (PBS) y se tiñeron con anexina V etiquetada con AlexaFluor 488 del kit de ensayo de apoptosis Vybrant® #2 (Molecular probes, V13241) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las células teñidas se cargaron en un cartucho que contenía yoduro de propidio. El cartucho se colocó en el aparato reivindicado y las células se contaron e investigaron usando el aparato reivindicado y software de desarrollo propio.

60 Las células también se investigaron usando un microscopio fluorescente Olympus IX50. Las imágenes se capturaron

usando una cámara Lumenera CCD y software de desarrollo propio. La fluorescencia de AF488 se detectó usando un cubo de filtros U-MWIBA3 (paso de banda azul) (Olympus) y la fluorescencia de PI se detectó usando un cubo de filtros U-MWG2 (paso largo verde) (Olympus).

- 5 **Resultados.** Usando el software asociado con el aparato reivindicado, se determinó que la concentración de células apoptóticas (células de unión a conjugado de anexina V) era $2,6 \times 10^5$ mientras que se descubrió que la concentración de células no viables era $4,5 \times 10^4$ (véase la figura 19). Investigando las células con microscopio de fluorescencia se descubrieron tres tipos de células: células visibles solamente en contraste de fases (células viables), células positivas tanto para PI como para anexina V etiquetada de forma fluorescente (células necróticas o
- 10 apoptóticas tardías) y finalmente células que excluyen PI pero positivas para tinción con anexina V etiquetada de forma fluorescente (células apoptóticas tempranas) (véase la figura 20).

Procedimientos alternativos. Un procedimiento alternativo para determinar la relación de células apoptóticas respecto al número total de células es combinar el procedimiento descrito anteriormente del ejemplo 17 con un tinte

15 para todas las células tal como naranja de acridina (AO) o un tinte que tiña solamente células viables tal como DACM. Por ejemplo, todas las células se tiñen con AO u otro compuesto que tiñe todas las células, combinado con anexina V etiquetada de forma fluorescente para teñir las células apoptóticas y un tinte incapaz de penetrar, que tiñe células no viables o todas las células viables se tiñen con DACM u otra sonda que reacciona con tiol, combinada con anexina V etiquetada de forma fluorescente para teñir las células apoptóticas y un tinte incapaz de penetrar, que tiñe

20 células no viables.

Ejemplo 18

DetECCIÓN DE APOPTOSIS TEMPRANA MONITORIZANDO CAMBIOS EN EL POTENCIAL DE LA MEMBRANA MITOCONDRIAL

25 Un acontecimiento muy temprano en la apoptosis es el colapso del gradiente electroquímico a través de la membrana mitocondrial seguido por el desacoplamiento de la cadena respiratoria. Con el fin de distinguir las células sanas y las apoptóticas, un ensayo simple basado en este fenómeno es teñir las células usando tintes catiónicos tales como yoduro de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbencimidazolcarbocianina (JC-1) o perclorato de éster

30 metílico de tetrametilrodamina u otros compuestos que fluorescen de manera diferente en las dos poblaciones. Uno de los ejemplos es JC-1 en células sanas, no apoptóticas que se encuentran en la matriz mitocondrial donde forma agregados rojos fluorescentes. Sin embargo, en el caso de una caída en el potencial de la membrana mitocondrial (por ejemplo en relación con la apoptosis) el colorante vuelve a su forma monomérica que se asocia con un gran cambio de emisión a verde.

35 Para el análisis de cambios en el potencial de la membrana mitocondrial y, por lo tanto, apoptosis, las células se incuban con el tinte catiónico seleccionado (por ejemplo JC-1) y se analizan a las longitudes de onda relevantes usando el aparato reivindicado. Si, por ejemplo, se está usando JC-1, el cambio de rojo a verde se cuantifica con el fin de determinar la población de células apoptóticas. Se puede incluir un tinte de ADN incapaz de penetrar en las

40 células (como DAPI) para teñir las células necróticas.

Ejemplo 19

ENSAYOS BASADOS EN CASPASA (CONSÚLTASE LA FIGURA 23)

45 Otro marcador temprano de apoptosis es la actividad de las caspasas. Las caspasas son una familia de proteasas específicas de ácido aspártico de cisteína. Las caspasas median la muerte celular y desempeñan papeles esenciales en la apoptosis, la necrosis y la inflamación. Las caspasas se regulan en un nivel postraducciona y, por lo tanto, se pueden activar rápidamente. El sitio de reconocimiento para las caspasas está marcado por de tres a

50 cuatro aminoácidos seguidos de un residuo de ácido aspártico, con la escisión produciéndose después del aspartato. Las caspasas se activan mediante la escisión proteolítica de un precursor y, dado que el sitio de escisión dentro de los precursores coincide con la especificidad de las caspasas, puede producirse la activación secuencial de precursores por caspasas activadas.

55 Una manera de medir la actividad de los diferentes tipos de caspasas es usar un sustrato peptídico que contiene el sitio de reconocimiento de la caspasa de interés unido a una sonda que cambia de propiedades fluorescentes después de la escisión en el residuo de ácido aspártico.

Un mediador clave de la apoptosis es la caspasa-3 (CPP32, apopain, YAMA) que amplifica la señal de las

60 caspasas iniciadoras, como la caspasa-8. Un ejemplo de un sustrato fluorógeno para caspasa-3 es acetil Asp-Glu-

Val-Asp (acetil-DEVD) 7-amido-4-metilcumarina, que tras la escisión da como resultado la liberación del resto 7-amino-4-metilcumarina fluorescente (AMC). La actividad de la caspasa puede cuantificarse de este modo midiendo la fluorescencia. La actividad de otras caspasas también se puede determinar aplicando el mismo concepto.

- 5 Usando el aparato reivindicado para cuantificar la actividad de la caspasa mediante este procedimiento, las células se permeabilizan/lisan y se incuban con el sustrato fluorógeno correspondiente a la o las caspasas de interés. Después de la incubación, se determina la fluorescencia de las células usando el aparato reivindicado y se usa como una medida para la actividad de la caspasa.
- 10 Otro ensayo de apoptosis basado en caspasa es el ensayo FLICA (ensayo de fluorocromo inhibidor de caspasas). Este ensayo detecta caspasas activas dentro de la célula usando una secuencia inhibidora específica de caspasa unida a una sonda fluorescente. El inhibidor no citotóxico específico de caspasa es capaz de penetrar en las células y pasa a través de la membrana plasmática intacta y se une covalentemente al residuo de cisteína reactivo en la subunidad grande del heterodímero de la caspasa activa. El inhibidor específico de caspasa no unido se difunde fuera de la célula y se elimina por lavado, por lo tanto, no hay interferencia de las procaspasas ni de las formas inactivas de la enzima. La medición de la fluorescencia proporciona una medida directa de la cantidad de caspasa activa en toda la célula viva.

Para cuantificar la actividad de caspasa mediante el ensayo FLICA, las células a investigar se incuban con la secuencia inhibidora específica de caspasa seleccionada, unida a una sonda fluorescente. Las células se lavan para eliminar el inhibidor no unido y la fluorescencia de las células se determina usando el aparato reivindicado, lo que hace posible la medición de la actividad de caspasa a nivel de una sola célula. Los tintes para células viables/todas tales como DACM o AO y/o células no viables tales como DAPI/PI pueden incluirse en el ensayo.

- 25 Materiales y procedimientos. Se cultivaron células CHO en RPMI (Invitrogen, N.º de Cat. 61870) suplementado con suero fetal bovino inactivado por calor al 10% (Invitrogen, N.º de Cat. 10108-165) a 37°C en una atmósfera de aire humidificada con CO₂ al 5%. A 80% de confluencia las células se trataron con nocodazol 1 µM (Sigma, N.º de Cat. M1404) o se dejaron sin tratar. Después de 16 horas de incubación, las células se recogieron en solución salina tamponada con fosfato fría (PBS) y se tiñeron con SR-VAD-FMK policaspasa FLICA (Immunochemistry Technologies, # 91) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Después de teñir, todas las células viables se cotiñeron usando DACM (N-(7-dimetilamino-4-metil-3-coumarinil)-maleimida, WAKO Pure Chemical Industries, n.º CAS 55145-14-7) y las células no viables se tiñeron con verde SYTOX (Invitrogen, S7020). Las células teñidas se cargaron en un cartucho NC-Slide. El cartucho NC-Slide se colocó en el aparato reivindicado y las células se contaron e investigaron usando el aparato reivindicado y software de desarrollo propio. Las células también se investigaron usando un microscopio fluorescente Olympus IX50. Las células fluorescentes rojas (positivas para apoptosis) se detectaron usando un cubo de filtros U-MWG2 (paso largo verde) (Olympus), las células positivas para DACM se detectaron usando el cubo de filtros U-MNUA2 (paso de banda UV) (Olympus) y las células fluorescentes con verde SYTOX se detectaron usando un cubo de filtros U-MWIBA3 (paso de banda azul) (Olympus).
- 40 Resultados. Usando el software asociado con el aparato reivindicado, la concentración de células apoptóticas - basándose en la actividad de caspasa - se determinó tanto para las células tratadas con nocodazol como las células no tratadas. Sustancialmente más células tratadas con nocodazol mostraron una intensa fluorescencia roja que las células no tratadas (véase la figura 23). Esta observación estaba apoyada por la inspección visual usando el microscopio de fluorescencia.

45

Ejemplo 20

TUNEL

- 50 Una característica de la apoptosis en fase tardía es la fragmentación de la cromatina nuclear que da como resultado una multitud de extremos 3'-hidroxilo de los extremos del ADN. Por lo tanto, un procedimiento comúnmente usado para la detección de apoptosis tardía es TUNEL (etiquetado de extremo libre por desoxinucleotidil transferasa biotina-dUTP terminal). El procedimiento TUNEL implica desoxinucleotidil transferasa terminal para transferir biotina-dUTP o dUTP marcada de forma fluorescente a las roturas de cadena del ADN escindido. Cuando se usa biotina-dUTP, los sitios de escisión etiquetados con biotina se hacen reaccionar adicionalmente con avidina o estreptavidina conjugada de forma fluorescente (por ejemplo, avidina FITC) para permitir la detección y cuantificación de la degradación del ADN y por lo tanto la apoptosis. Usando dUTP marcado de forma fluorescente esto se hace directamente. Las células no apoptóticas incorporan bajos niveles de dUTP etiquetado debido a la ausencia de extremos 3'-hidroxilo de ADN, expuestos en estas células.

60

Dado que la desoxinucleotidil transferasa terminal tiene que entrar en la célula, la membrana plasmática debe ser permeabilizada antes de la reacción enzimática. Para evitar que esto cause la pérdida del ADN fragmentado, las células se fijan con formaldehído o glutaraldehído antes de la permeabilización. Esta fijación reticula el ADN con otros componentes celulares e impide su extracción durante la permeabilización. Por lo tanto, el procedimiento para detectar la apoptosis tardía usando el aparato reivindicado es el siguiente: las células a investigar se fijan y luego se permeabilizan. Las células se incuban después con desoxinucleotidil transferasa terminal y se etiquetan en dUTP con el marcador preferido (biotina, sonda fluorescente o anticuerpo). Durante la incubación, la desoxinucleotidil transferasa terminal cataliza la unión de dUTP a los extremos 3'-hidroxilo en el ADN. Después del lavado, las células teñidas se investigan usando el aparato reivindicado, lo que permite la medición de la apoptosis a nivel de una sola célula. Los tintes para todas las células tales como DAPI, PI o AO pueden incluirse en el ensayo (dado que las células son permeabilizadas pueden usarse tintes incapaces de penetrar así como capaces de penetrar).

Ejemplo 21

15 Proliferación celular

La proliferación celular es la medición del número de células que se dividen en una cultura. La valoración rápida y precisa de la proliferación celular es un requisito en muchas configuraciones experimentales y es muy útil para evaluar por ejemplo los efectos citotóxicos, mutágenos y carcinógenos de compuestos químicos en células eucariotas y para estimar el tiempo de duplicación celular y verificar la salud de cultivos celulares. Una manera de estimar este parámetro es midiendo las curvas de crecimiento, sin embargo, esto es tedioso y lento. Una segunda manera de analizar la proliferación celular es mediante el uso de la síntesis de ADN como marcador de proliferación. En estos ensayos, se cuantifica la incorporación de análogos de nucleótidos en el ADN. La incorporación del análogo de nucleótido en el ADN es directamente proporcional a la cantidad de división celular que se produce en el cultivo.

En un procedimiento de análisis, las células se incuban con bromodesoxiuridina (BrdU) durante las últimas 2 a 24 horas de incubación. La BrdU se incorporará al ADN de las células en división y se detectará y cuantificará usando un anticuerpo anti-BrdU. Con el fin de facilitar la unión del anticuerpo a la BrdU incorporada, las células se permeabilizan y el ADN se desnaturaliza mediante una solución de fijación/desnaturalización en una etapa. Después de la incubación del anticuerpo, el anticuerpo no unido se elimina por lavado y se añade a la solución un anticuerpo secundario conjugado con fluorocromo (por ejemplo anticuerpo etiquetado con FITC) que reconoce el anticuerpo anti-BrdU. El anticuerpo secundario no unido se elimina por lavado y la fluorescencia celular se detecta y se cuantifica usando el aparato reivindicado. La intensidad de la señal fluorescente es proporcional a la cantidad de BrdU incorporada en las células. Además de la evaluación de la proliferación celular, se puede obtener información, por ejemplo, sobre el número de células y los antígenos celulares, a partir de la misma muestra a nivel de célula individual.

Una tercera manera de analizar la proliferación celular implica el etiquetado de células con un colorante fluorescente que es retenido dentro de la célula sin afectar a la función celular. Para cada ronda de división celular, la intensidad de la fluorescencia se reduce a la mitad.

En un procedimiento de análisis, las células se incuban con ésteres succinimidílicos de diacetato reactivos con amina (comúnmente denominados SE), que se difunden libremente en las células. Los colorantes fluorescentes reaccionan con proteínas intracelulares así como proteínas presentes en la superficie celular. Tras la reacción, los colorantes fluorescentes se unen covalentemente a las proteínas y, por lo tanto, son retenidos dentro de la célula. La fluorescencia celular se detecta y se cuantifica usando el aparato reivindicado y, a medida que una célula se divide, la intensidad de fluorescencia se reduce a la mitad. Además de la evaluación de la proliferación celular, se puede obtener información sobre, por ejemplo, el número de células, la viabilidad y los antígenos celulares, a partir de la misma muestra a nivel de una sola célula. Por ejemplo, se puede incluir un tinte de ADN incapaz de penetrar en las células (como DAPI) en el ensayo para discernir el porcentaje de células que están muertas.

Ejemplo 22

55 Detección y cuantificación de proteínas fluorescentes, en lo sucesivo análisis FRET

Ahora se ha desarrollado una amplia gama de variantes de proteínas fluorescentes que presentan perfiles espectrales de emisión de fluorescencia que abarcan casi todo el espectro de luz visible. La mutagénesis de la proteína fluorescente verde original (GFP) aislada de la medusa *Aequorea victoria* ha dado lugar a nuevas sondas fluorescentes que varían en color desde el azul hasta el amarillo y son algunas de las moléculas reporteras *in vivo*

más utilizadas en la investigación biológica. Proteínas fluorescentes de longitud de onda más larga, que emiten en las regiones espectrales naranja y roja, se han desarrollado a partir de la anémona marina *Discosoma striata* y corales de arrecife pertenecientes a la clase Anthozoa. El aparato reivindicado puede detectar las proteínas fluorescentes conocidas, incluyendo BFP, CFP, GFP, GFP-uv, YFP, HcRed1, KFP1, mRFP1, mCherry y otras variantes derivadas de dsRED.

En un procedimiento de análisis, la región de codificación de la proteína fluorescente está unida a un promotor (o potenciador) de un gen de interés. La construcción de fusión se transfecta a una célula huésped y la fluorescencia emitida por la proteína fluorescente producida se detecta y cuantifica fácilmente mediante el aparato reivindicado. La intensidad de la señal fluorescente es proporcional al nivel de expresión de la proteína fluorescente, que de nuevo es una medida de la actividad del gen de interés. Por lo tanto, este procedimiento puede usarse para estudiar la actividad transcripcional de un gen de interés en diversas condiciones de crecimiento.

En un segundo procedimiento de análisis, la región de codificación de la proteína fluorescente está unida a la región de codificación o parte de la región de codificación de un gen de interés. La construcción se transfecta a una célula huésped y la fluorescencia emitida por la proteína de fusión producida se detecta y se cuantifica mediante el aparato reivindicado. La intensidad de la señal fluorescente es proporcional al nivel de expresión de la proteína de fusión fluorescente, que de nuevo es una medida del nivel de la proteína de interés. Este procedimiento puede usarse para estudiar la dinámica de una proteína de interés, tal como la medición de la estabilidad de la proteína y la semi-vida de la proteína en diversas condiciones de crecimiento.

El uso de proteína fluorescente permite el estudio de las interacciones proteína-proteína dinámicas moleculares dentro de las células vivas. Una forma de detectar interacciones moleculares implica la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) entre dos proteínas fluorescentes o entre una única proteína fluorescente y un segundo fluoróforo. Por ejemplo, YFP y CFP pueden funcionar como un par donador-receptor para FRET, en el que la excitación de la molécula donadora (cian) conduce a la emisión de la molécula aceptora (amarilla), siempre que las proteínas estén lo suficientemente cerca para que se produzca la transferencia de energía. Por lo tanto, puede usarse FRET para controlar las interacciones directas proteína-proteína entre las proteínas de fusión EYFP y ECFP en las células. En un procedimiento de análisis, la región codificante de la proteína cian fluorescente (CFP) está unida a la región codificante o parte de la región codificante de un gen de interés. Asimismo, la región codificante de la proteína amarilla fluorescente (YFP) está unida a la región codificante o parte de la región codificante de un segundo gen de interés. Las dos proteínas de fusión se coexpresan en una célula huésped. La CFP se excita con luz violeta y se detecta y cuantifica la luz amarilla emitida por YFP.

35 Ejemplo 23

Detección y cuantificación de marcadores de ADN y ARN usando FISH

La microscopía de fluorescencia a bajo aumento es muy útil para obtener información precisa y exacta sobre la amplificación génica y los niveles de expresión de los marcadores de ARN en poblaciones celulares usando la hibridación fluorescente in situ (FISH).

En un procedimiento de análisis, las células se permeabilizan y el ADN se desnaturaliza mediante una solución de fijación/desnaturalización en una etapa que facilita la hibridación de sondas de nucleótidos específicas, tales como ADN, ARN, ANP y ANB, marcadas con un fluorocromo (por ejemplo, anticuerpo marcado con FITC) Después de la hibridación, la sonda conjugada con fluorocromo no unida se elimina por lavado y la fluorescencia celular se detecta y se cuantifica usando el aparato reivindicado. La intensidad de la señal fluorescente es proporcional a la cantidad del marcador de ADN o ARN presente en las células. El procedimiento puede usarse para la detección y cuantificación de amplificación de ADN, por ejemplo HER2 y TOP, y de niveles de ARN, por ejemplo, ARNm de TERT. Además de la evaluación de los marcadores de ADN y ARN, se puede obtener información sobre, por ejemplo, el número de células, el contenido de ADN y los antígenos de la misma muestra a nivel de una sola célula.

Ejemplo 24

55 Efectos de fármacos sobre el contenido de ADN en células de mamífero (consúltase la figura 21)

El contenido de ADN de células CHO tratadas con nocodazol (inhibidor de la fase M) y células JM tratadas con camptotecina (inhibidor de la fase S) se midió usando DAPI como tinte de ADN.

60 Materiales y procedimientos. Se cultivaron células CHO en RPMI + FCS al 10% al 80-90% de confluencia y se

trataron con nocodazol 0,5 μM durante 24 horas. Las células se lavaron una vez en PBS, se tripsinizaron y se recogieron mediante centrifugado antes de la fijación con etanol. Se cultivaron células JM en RPMI + FCS al 10% a una densidad de $5,0 \times 10^5$ células/ml y se trataron con camptotecina 5 μM durante 16 horas. Las células se recogieron por centrifugado y se lavaron una vez en PBS antes de la fijación con etanol. Las células CHO y JM se resuspendieron minuciosamente en 0,5 ml de PBS y las suspensiones celulares se añadieron, cada una, a 4,5 ml de fijador etanol al 70% enfriado con hielo. Las células se mantuvieron en el fijador durante al menos dos horas antes de teñir con DAPI. Para tinción con DAPI las células se recogieron por centrifugado durante 5 min a $200 \times g$ y se lavaron una vez con PBS. Después de otro centrifugado, las células se resuspendieron en solución de tinción de DAPI (A 100 ml de Triton X-100 al 0,1% (v/v) en PBS se le añaden 0,1 mg de 4',6-diamidino-2-fenilindol; DAPI) y se analizaron directamente mediante el aparato reivindicado.

Resultados. El contenido de ADN de células CHO y JM tratadas con fármacos que afectan a diferentes fases del ciclo celular se analizaron mediante el aparato reivindicado. Tal como se muestra en la figura 21, el aparato reivindicado proporciona datos exactos y precisos sobre el contenido de ADN celular y puede usarse para evaluar los efectos de diferentes fármacos sobre el ciclo celular. Además, el aparato reivindicado puede usarse para identificar células con ADN fragmentado (llamadas células sub- G_1). La fragmentación del ADN es una marca distintiva de la muerte celular apoptótica.

Ejemplo 25

Ensayos de apoptosis con anexina V (consúltese la figura 22)

En este caso, el aparato reivindicado se usa para ensayar la anexina V etiquetada de forma fluorescente para teñir las células apoptóticas y necróticas y verde SYTOX para distinguir entre las células apoptóticas/necróticas tempranas y tardías. Además, se utiliza DACM para teñir todas las células viables.

Materiales y procedimientos. Se cultivaron células Jurkat a 37°C en una atmósfera de aire humidificada con CO_2 al 5% en RPMI (Invitrogen, N.º de Cat. 61870) suplementado con suero fetal bovino inactivado por calor al 10% (Invitrogen, N.º de Cat. 10108-165). Las células se trataron con nocodazol 1 μM (Sigma, N.º de Cat. M1404) o se dejaron sin tratar. Después de 16 horas de incubación (37°C , CO_2 al 5%) las células se recogieron en solución salina tamponada con fosfato fría (PBS) y se tiñeron con anexina V etiquetada con AlexaFluor 594 (Molecular probes, A-13203) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Después de la tinción con anexina V todas las células viables se cotiñeron usando DACM (N-(7-dimetilamino-4-metil-3-coumarinil)-maleimida, WAKO Pure Chemical Industries, n.º CAS 55145-14-7) y las células no viables se tiñeron con verde SYTOX (Invitrogen, S7020). Las células teñidas se cargaron en un cartucho NC-Slide. El cartucho NC-Slide se colocó en el aparato reivindicado y las células se contaron e investigaron usando el aparato reivindicado y software de desarrollo propio. Las células también se investigaron usando un microscopio fluorescente Olympus IX50. La fluorescencia de verde SYTOX se detectó usando un cubo de filtros U-MWIBA3 (paso de banda azul) (Olympus), el conjugado de anexina V AF594 se detectó usando un cubo de filtros U-MWG2 (paso largo verde) (Olympus) y DACM se detectó usando el cubo de filtros U-MNUA2 (paso de banda UV) (Olympus).

Resultados. Usando el software asociado con el aparato reivindicado, la concentración de células apoptóticas (células de unión a conjugado de anexina V) se determinó tanto para células tratadas con nocodazol como para las células no tratadas. Las células no viables se discriminaron basándose en tinción con verde SYTOX. El análisis de las células viables mostró que, aunque menos del 10% de las células de control fueron positivas para anexina V, más del 40% de las células tratadas con nocodazol fueron positivas para anexina V (véase la figura 22), mientras que la viabilidad casi no resultó afectada. Esta observación estaba apoyada por la inspección visual usando el microscopio de fluorescencia.

Ejemplo 26

Detección de apoptosis temprana monitorizando cambios en el potencial de la membrana mitocondrial (consúltese la figura 24)

Se sabe que la pérdida del potencial de la membrana mitocondrial precede a la apoptosis y la necrosis inducida por hipoxia química. El colorante catiónico lipófilo JC-1 (yoduro de 5, 5, 6, 6-tetracloro-1, 3, 3-tetraetilbencimidazol-carbocianina) muestra una acumulación dependiente de potencial en la mitocondria y proporciona un procedimiento sencillo basado en fluorescencia para distinguir entre células sanas y apoptóticas. En células sanas, la carga negativa establecida por el potencial de la membrana mitocondrial intacta facilita la acumulación de JC-1 en la matriz mitocondrial. A altas concentraciones, JC-1 forma agregados y se vuelve fluorescente rojo. En las células

apoptóticas, el potencial mitocondrial colapsa y JC-1 se localiza en el citosol en su forma fluorescente verde monomérica. Se puede incluir un tinte de ADN incapaz de penetrar en las células (como DAPI) para teñir las células apoptóticas tardías y necróticas.

5 Materiales y procedimientos. Se cultivaron células Jurkat en RPMI + FCS al 10% a una densidad de $5,0 \times 10^5$ células/ml y se trataron con camptotecina $10 \mu\text{M}$ (fármaco inductor de apoptosis) durante 5 horas. Las células se tiñeron con $2,5 \mu\text{g/ml}$ de JC-1 durante 10 minutos a 37°C , se lavaron con PBS, se resuspendieron en PBS + $1 \mu\text{g/ml}$ de DAPI y se analizaron usando el aparato reivindicado.

10 Resultados. Las células Jurkat teñidas con JC-1 y DAPI se analizaron mediante el aparato reivindicado (figura 24). Las fluorescencias roja y verde se cuantificaron para identificar células apoptóticas (figura 24A). Para estimar el número de células necróticas/apoptóticas tardías, se contaron las células positivas para DAPI (azul) (figura 24B). Tal como se muestra en la figura 24, el aparato reivindicado puede usarse para identificar células con potencial de la membrana mitocondrial colapsado y permite la identificación de células apoptóticas tempranas.

15

Ejemplo 27

DetECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ANTÍGENOS (CONSÚLTASE LA FIGURA 25)

20 La microscopía de fluorescencia a bajo aumento es muy útil para obtener información precisa y exacta sobre el nivel de expresión de antígenos, tales como las proteínas intracelulares y de superficie celular, en poblaciones celulares.

Un ejemplo de esto se describe a continuación. Las células se incuban con un anticuerpo primario que reconoce un antígeno. Después de la incubación con el anticuerpo, el anticuerpo no unido se elimina por lavado y se añade a la

25 solución un anticuerpo secundario conjugado con fluorocromo (por ejemplo, anticuerpo etiquetado con FITC o PE) que reconoce el anticuerpo primario. El anticuerpo secundario no unido se elimina por lavado y la fluorescencia celular se detecta y se cuantifica usando el aparato reivindicado. La intensidad de la señal fluorescente es proporcional a la cantidad del antígeno celular presente. El procedimiento puede usarse para la detección y cuantificación de diferentes antígenos celulares tales como moléculas HER2, EGFR, VEGFR, UPR y CD, que incluyen
30 CD3, CD4 y CD8. Además de la evaluación del antígeno, se puede obtener información sobre, por ejemplo, el número de células, la viabilidad y el contenido de ADN de la misma muestra a nivel de una sola célula. Los antígenos intracelulares tales como los marcadores de cáncer TERT, TOP y Survivina pueden detectarse mediante un procedimiento similar fijando y permeabilizando las células antes de la incubación con anticuerpo. En lugar de
35 combinar la detección de marcadores intracelulares con la medición de la viabilidad, puede combinarse con la cuantificación de, por ejemplo, el contenido de ADN y, por lo tanto, el perfil del ciclo celular.

Materiales y procedimientos. Células T positivas para CD3+ se purificaron a partir de la fracción que contenía linfocitos de una capa leucocitaria separada por Lymphoprep (Axis-Shield, #1114544) mediante selección positiva

40 continuación con anticuerpo primario específico de CD3 y, después de 30 minutos de incubación, las células se lavaron y se tiñeron a continuación con anticuerpo secundario etiquetado con R-ficoeritrina (PE) (Anticuerpos de BD BioSciences). Después de 30 minutos de incubación, las células se lavaron nuevamente y todas las células viables se cotiñeron usando DACM (N-(7-dimetilamino-4-metil-3-cumarinil)-maleimida, WAKO Pure Chemical Industries, n.º CAS 55145-14-7). Las células teñidas se cargaron en un cartucho NC-Slide. El cartucho NC-Slide se colocó en el
45 aparato reivindicado y las células se contaron e investigaron usando el aparato reivindicado y software de desarrollo propio.

Resultados. Usando el aparato reivindicado para analizar células purificadas usando microperlas selectivas para CD3, se descubrió que el 95% de las células se tiñeron con el anticuerpo conjugado a PE, lo que indica que el 95%

50 de todas las células expresaron CD3 (figura 25). Esto es conforme a los datos que normalmente se consiguen mediante citometría de flujo de células seleccionadas positivamente mediante purificación con microperlas.

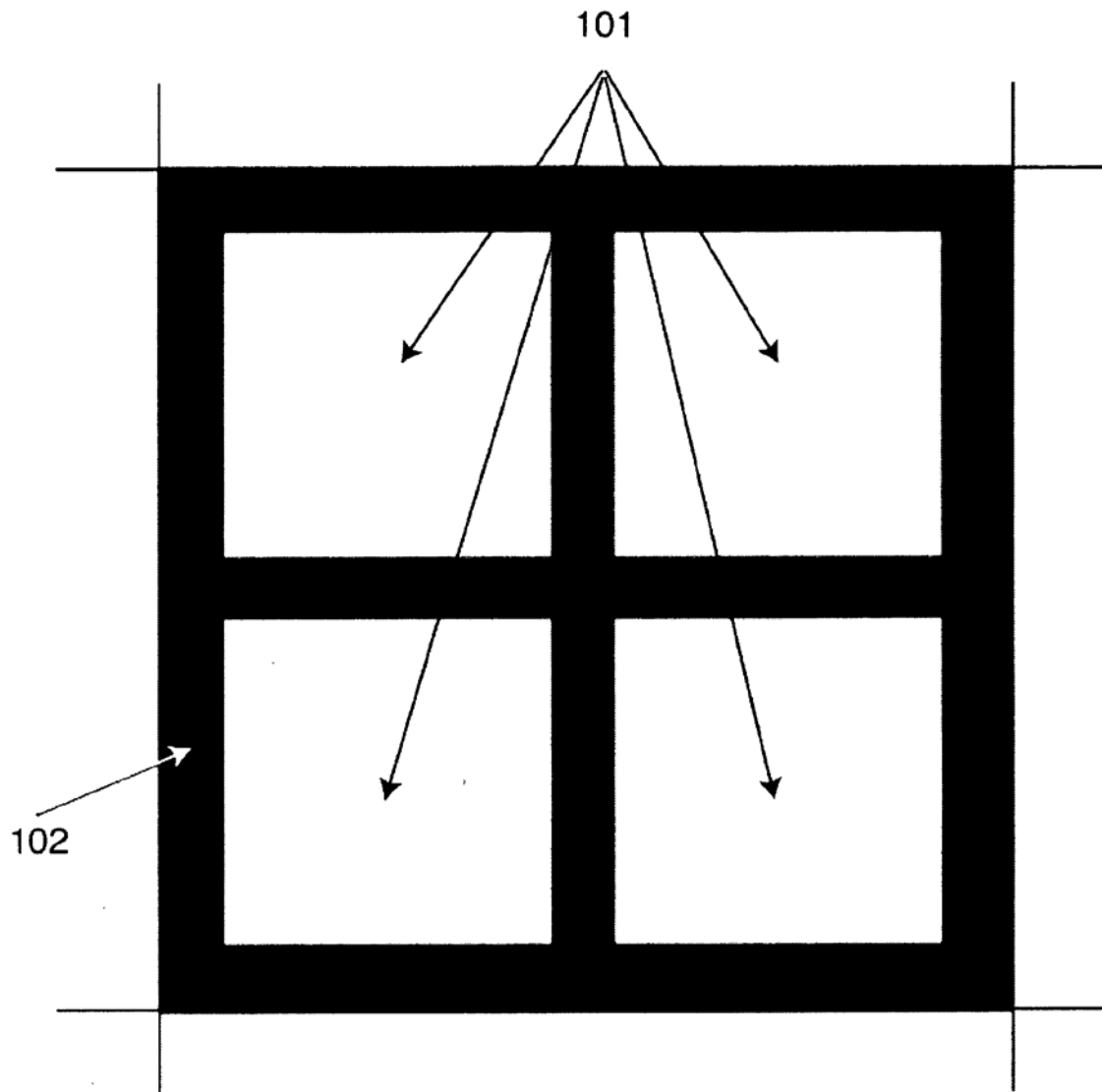
REIVINDICACIONES

1. Un aparato para detectar fluorescencia proveniente de una muestra, comprendiendo dicho aparato:
- 5 un plano para muestras sobre el que se dispone la muestra;
una unidad de luz de excitación que incluye al menos una fuente de luz para iluminar la muestra;
una unidad de detección que comprende al menos un detector que tiene al menos 400.000 elementos de detección activos para detectar una señal de fluorescencia proveniente de la muestra, adquiriendo de este modo una imagen de la muestra; y
- 10 una unidad de alineamiento de imagen configurada para generar una imagen alineada a partir de una pluralidad de imágenes, que muestran información espectral diferente, adquiridas a partir de una pluralidad de señales de fluorescencia detectadas de la muestra, obtenidas en condiciones de emisión diferentes o sustancialmente diferentes.
- 15 2. El aparato de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende un portamuestras adaptado para sostener al menos dos tipos diferentes de dispositivos para muestras, tales como el plano para muestras, un portaobjetos de microscopio o una cámara de hemocitómetro.
3. El aparato de acuerdo con la reivindicación 2, que comprende además un medio para leer una
20 insignia, que representa una propiedad dimensional predeterminada del portamuestras.
4. El aparato de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la fuente de luz se selecciona de entre una fuente de luz dispersiva, un diodo emisor, un diodo láser, un láser, una fuente de luz térmica y una fuente de luz en estado sólido.
- 25 5. El aparato de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la unidad de luz de excitación comprende una pluralidad de fuentes de luz preferentemente al menos cuatro fuentes de luz diferentes, tales como al menos seis fuentes de luz diferentes, tales como al menos ocho fuentes de luz diferentes, tales como al menos 10 fuentes de luz diferentes donde la pluralidad de fuentes de luz preferentemente emiten luz de diferentes
30 longitudes de onda.
6. El aparato de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la unidad de detección comprende al menos un detector que tiene al menos 1.000.000 de elementos de detección activos, aún más preferentemente 2.000.000 de elementos de detección activos.
- 35 7. El aparato de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además una agrupación ordenada de elementos detectores que se disponen en una disposición bidimensional para permitir la adquisición simultánea de información espacial a partir de la muestra.
- 40 8. El aparato de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además una primera unidad de enfoque para enfocar la luz de excitación sobre la muestra y/o que comprende una segunda unidad de enfoque para enfocar la señal de fluorescencia sobre la unidad de detección.
9. El aparato de acuerdo con la reivindicación 8, donde la primera unidad de enfoque y la segunda
45 unidad de enfoque se seleccionan de entre una lente, y una agrupación ordenada de lentes.
10. El aparato de acuerdo con la reivindicación 8 o 9, donde la primera unidad de enfoque y la segunda unidad de enfoque proporcionan un aumento óptico fijo de 40X o menos, preferentemente 20X o menos, más preferentemente 10X o menos.
- 50 11. El aparato de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además un filtro de luz de excitación, insertado en una trayectoria de luz de excitación dirigida desde al menos una de las fuentes de luz, para separar la luz de excitación en una pluralidad de bandas de longitud de onda de excitación antes de la iluminación de la muestra y/o que comprende un filtro de luz de emisión, insertado en una trayectoria de
55 luz de emisión dirigida a al menos uno de los detectores, para separar la señal de fluorescencia en una pluralidad de bandas de longitud de onda de emisión antes de la detección de la señal de fluorescencia en la unidad de detección.
12. El aparato de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además un interferómetro para modular la señal de fluorescencia emitida desde la muestra.
- 60

13. El aparato de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además un accionador para mover el plano para muestras y/o al menos una de las unidades para modular la luz emitida desde la muestra.
- 5 14. El aparato de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además una unidad de control para mover el plano para muestras a una posición predeterminada con respecto al campo de visión de la unidad de detección.
15. El aparato de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la unidad de luz de
10 excitación y la unidad de detección están colocadas a cada lado del plano para muestras.
16. El aparato de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la unidad de luz de excitación y la unidad de detección están colocadas en el mismo lado del plano para muestras.
- 15 17. El aparato de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además un procesador acoplado a la unidad de detección para recibir datos de señal de la señal de fluorescencia proveniente de la unidad de detección, para procesar los datos de señal, correlacionar los datos de señal con un parámetro a valorar y valorar el parámetro.
- 20 18. El aparato de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además al menos 4 filtros de emisión diferentes, tales como al menos 6 filtros de emisión diferentes, tales como al menos 10 filtros de emisión diferentes, tales como al menos 15 filtros de emisión diferentes, tales como al menos 20 filtros de emisión diferentes.
- 25 19. El aparato de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores 3 - 18, donde la propiedad dimensional predeterminada de dicho compartimento para muestras es el grosor del compartimento para muestras.
20. El aparato de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende un sistema óptico que comprende una unidad de lente, que tiene una agrupación ordenada de microlentes donde la agrupación
30 ordenada de microlentes comprende una pluralidad de lentes dispuestas en una disposición bidimensional, para recibir la luz de excitación y generar una luz de iluminación que es dirigida hacia el plano para muestras; donde, la unidad de lente produce una luz de iluminación homogénea que se proyectará sobre una región de iluminación del plano para muestras con una eficacia de iluminación elevada.
- 35 21. Un procedimiento para detectar fluorescencia proveniente de una muestra, comprendiendo dicho procedimiento:
disponer una muestra sobre un plano para muestras;
iluminar la muestra con una luz de excitación usando una unidad de luz de excitación que tiene al menos una fuente de luz;
40 detectar una señal de fluorescencia proveniente de la muestra usando una unidad de detección que comprende al menos un detector que tiene al menos 400.000 elementos de detección activos, adquiriendo de este modo una imagen de la muestra; y
generar una imagen alineada a partir de una pluralidad de imágenes, que muestran información espectral diferente, de la muestra adquirida a partir de una pluralidad de señales de fluorescencia detectadas obtenidas en condiciones
45 de emisión diferentes o sustancialmente diferentes usando una unidad de alineamiento de imagen.
22. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 21, donde la muestra contiene una partícula.
23. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 22, donde la partícula o el material contenido sobre
50 o dentro de la partícula es activo fotoluminiscente, generando la señal de fluorescencia cuando la muestra es iluminada.
24. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 22-23, que comprende además etiquetar la partícula con un material activo fotoluminiscente, preferentemente material fluorescente.
55
25. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 22-24, donde la partícula se selecciona de entre una célula animal, tal como una célula de mamífero, célula de insecto y célula de pez, de entre una célula de hongo, tal como una célula de levadura y una bacteria.
- 60 26. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 21-25, que comprende además

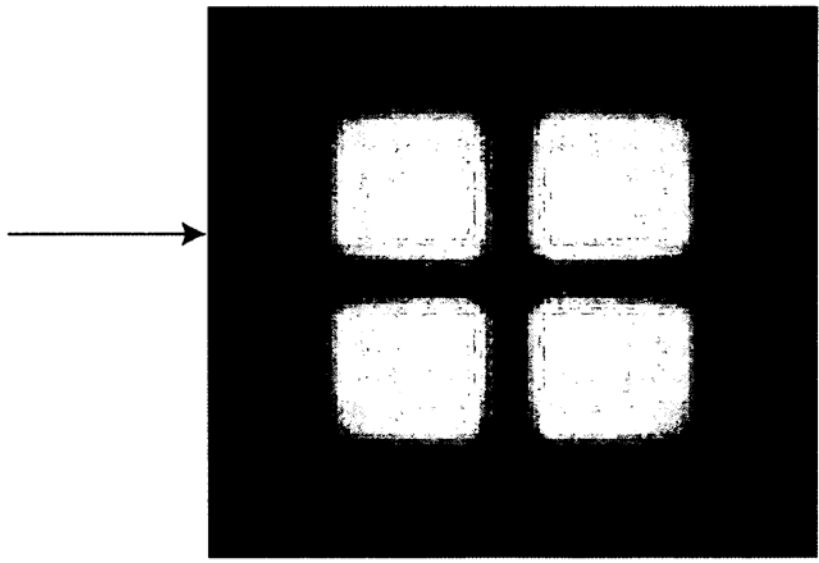
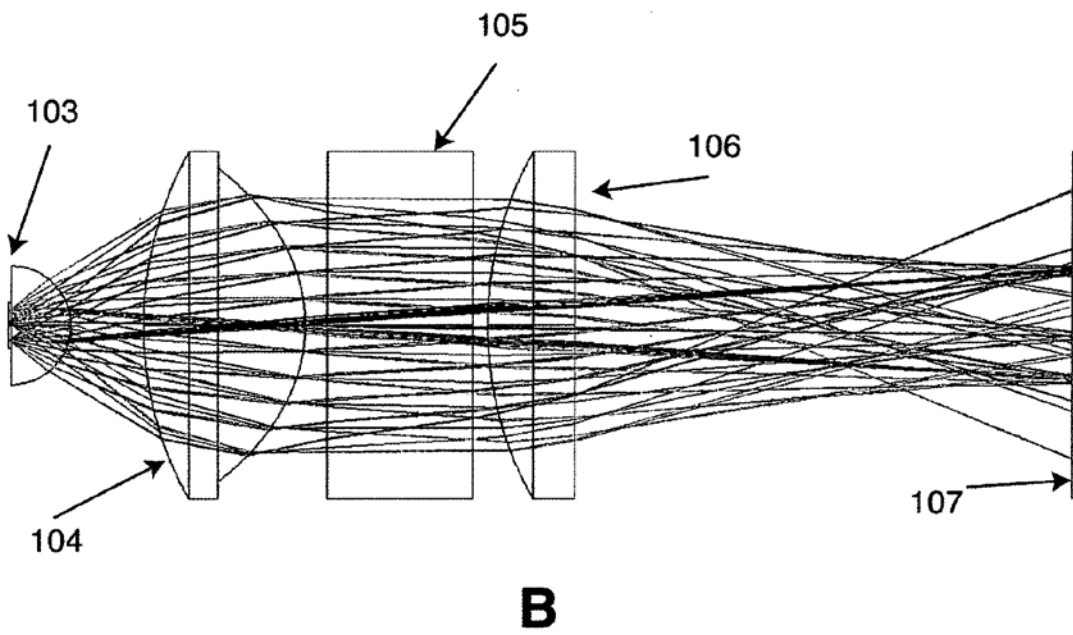
leer una insignia que representa una propiedad dimensional predeterminada del portamuestras.

27. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 21-26, donde la fuente de luz se selecciona de entre una fuente de luz dispersiva, un diodo emisor, un diodo láser, un láser, una fuente de luz térmica y una fuente de luz en estado sólido.
28. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 21-27, donde la unidad de luz de excitación comprende una pluralidad de fuentes de luz.
- 10 29. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 21-28, que comprende además disponer una primera unidad de enfoque para enfocar la luz de excitación sobre la muestra y/o disponer una segunda unidad de enfoque que enfoca la señal de fluorescencia sobre la unidad de detección.
- 30 El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 29, donde la primera unidad de enfoque y la
15 segunda unidad de enfoque se seleccionan de entre una lente, y una agrupación ordenada de lentes.
31. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 29-30, donde la primera unidad de enfoque y la segunda unidad de enfoque proporcionan un aumento fijo de 40X o menos, preferentemente 20X o menos, más preferentemente 10X o menos.
- 20 32. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 21-31, que comprende además insertar un filtro de luz de excitación en una trayectoria de luz de excitación dirigida desde al menos una de las fuentes de luz, para separar la luz de excitación en una pluralidad de bandas de longitud de onda de excitación antes de la iluminación de la muestra y/o que comprende insertar un filtro de luz de emisión en una trayectoria de luz
25 de emisión dirigida a al menos uno de los detectores, para separar la señal de fluorescencia en una pluralidad de bandas de longitud de onda de emisión antes de la detección de la señal de fluorescencia en la unidad de detección.
33. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 32, que comprende además analizar una combinación de bandas de longitud de onda de excitación y bandas de longitud de onda de emisión seleccionando
30 una combinación de filtros de luz de excitación y filtros de luz de emisión respectivamente.
34. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 21-33, que comprende además modular la señal de fluorescencia emitida desde la muestra usando un interferómetro.
- 35 35. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 21-34, que comprende además mover el plano para muestras y/o al menos una de las unidades usando un accionador para modular la luz emitida desde la muestra.
36. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 21-35, que comprende además
40 mover el plano para muestras hasta una posición predeterminada con respecto al campo de visión de la unidad de detección usando una unidad de control.
37. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 21-36, que comprende además procesar datos de señal de la señal de fluorescencia recibida desde la unidad de detección; correlacionar los datos
45 de señal con un parámetro a valorar; y valorar el parámetro.



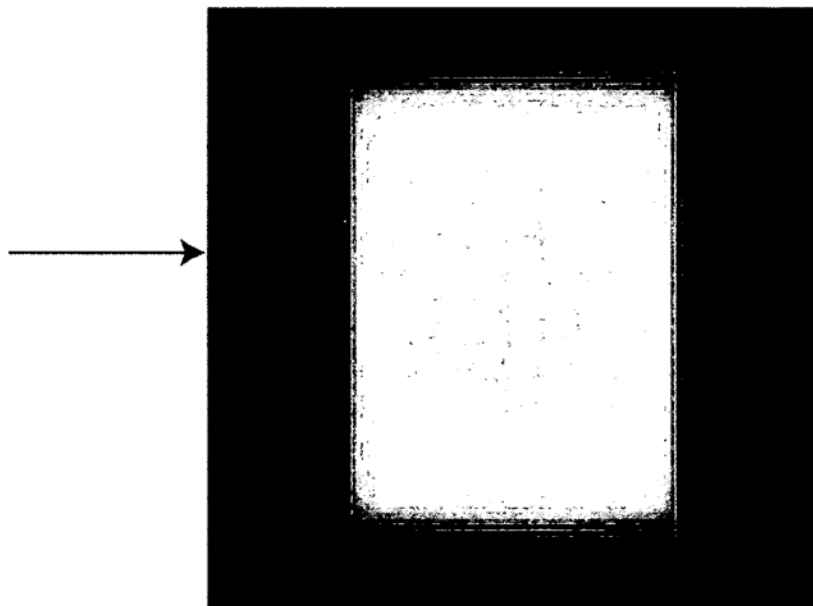
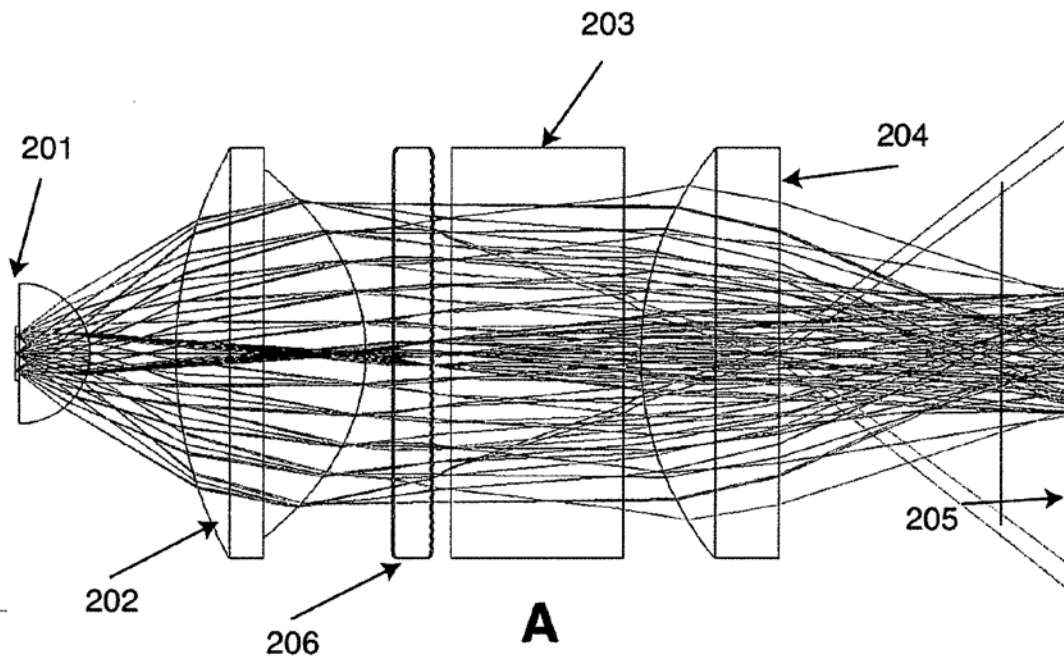
A

Figura 1



C

Figura 1 (continuación)



B
Figura 2

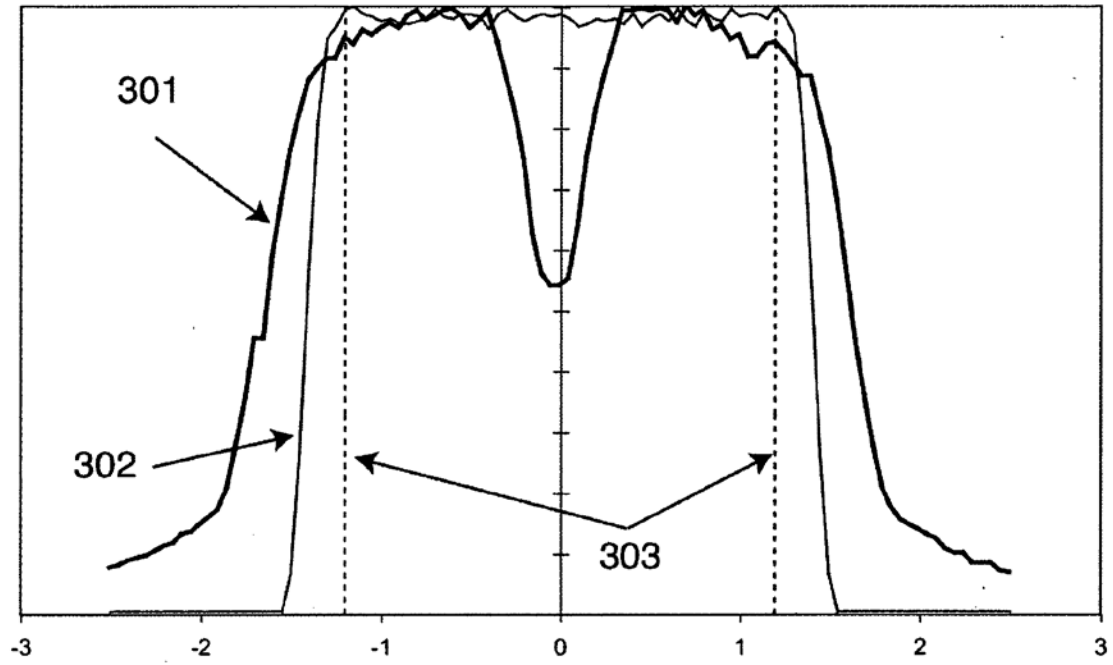
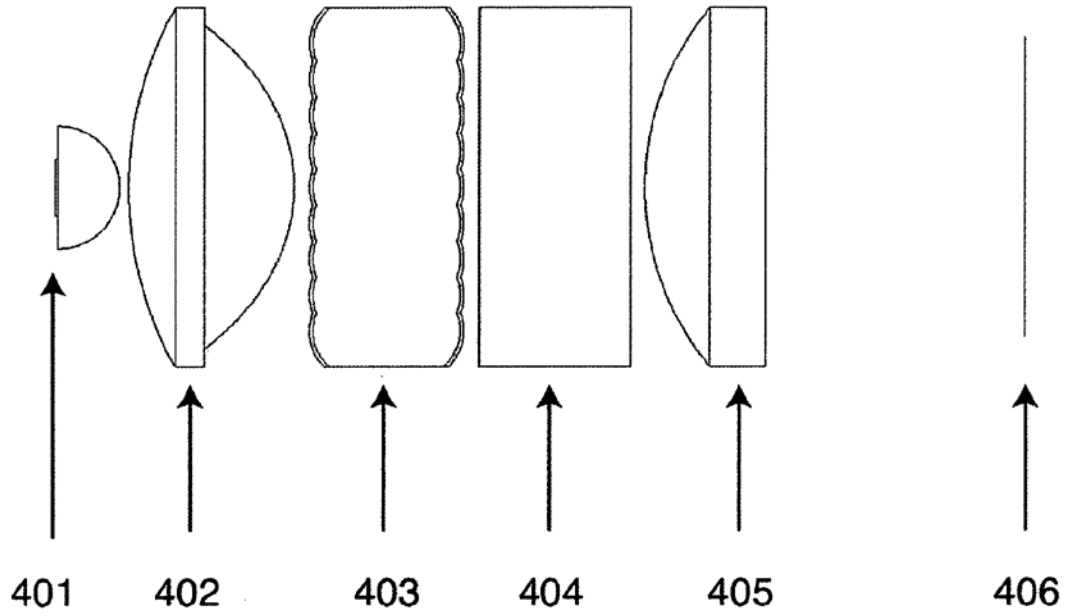
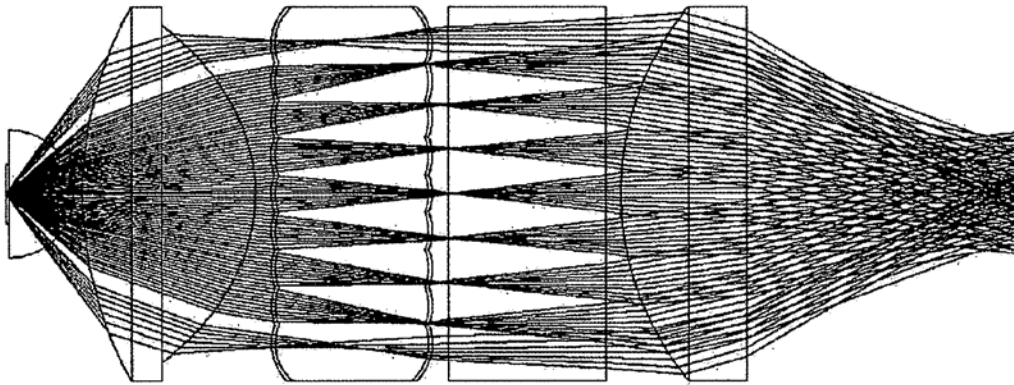


Figura 3

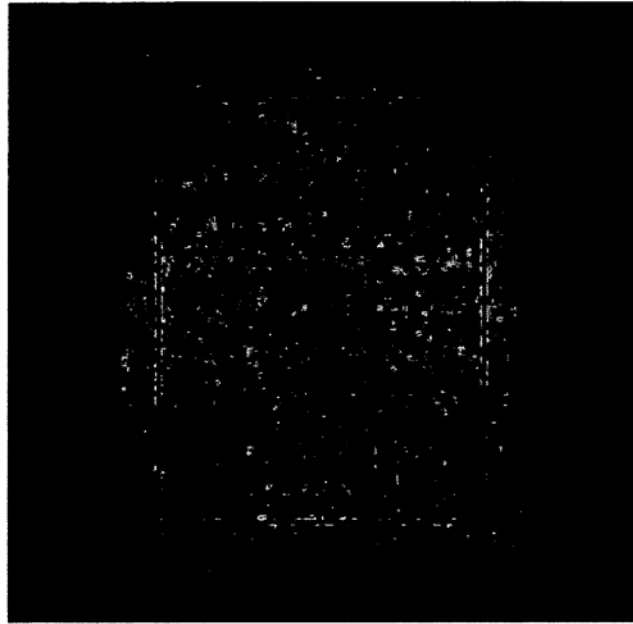


A

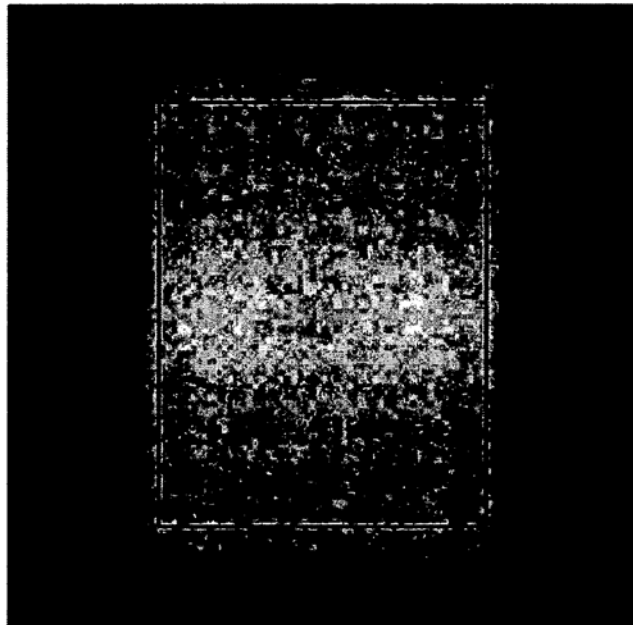


B

Figura 4

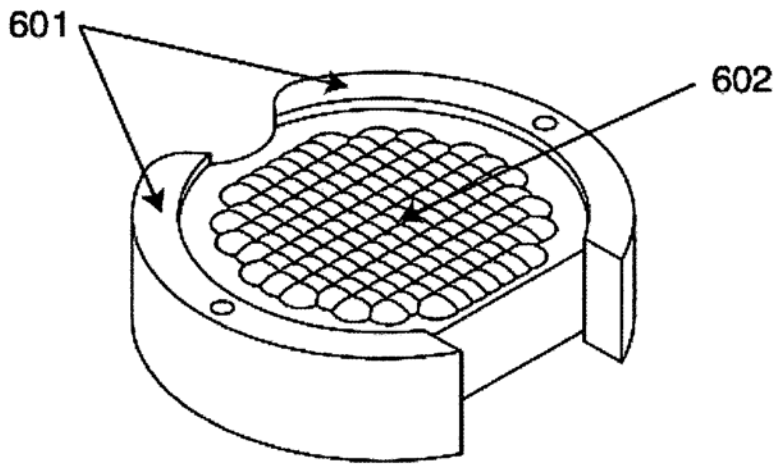


A

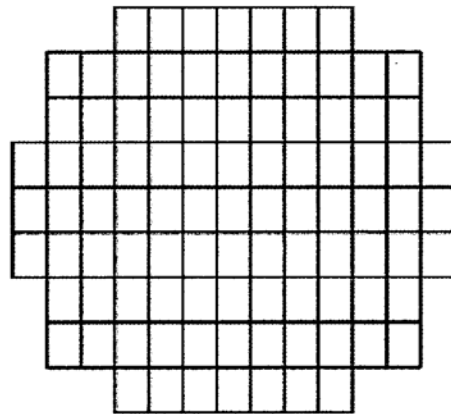


B

Figura 5

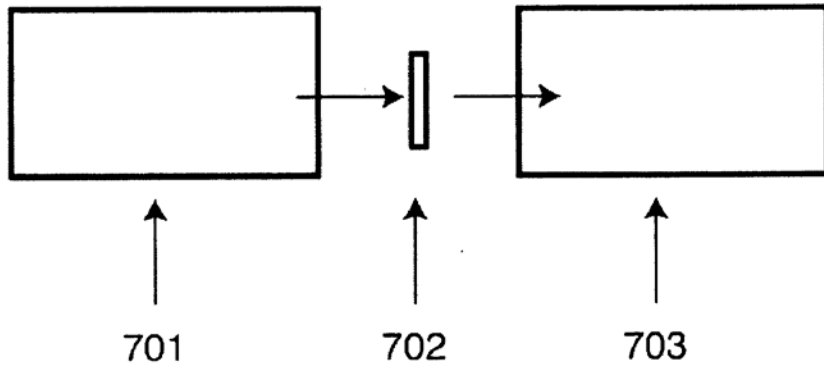


A

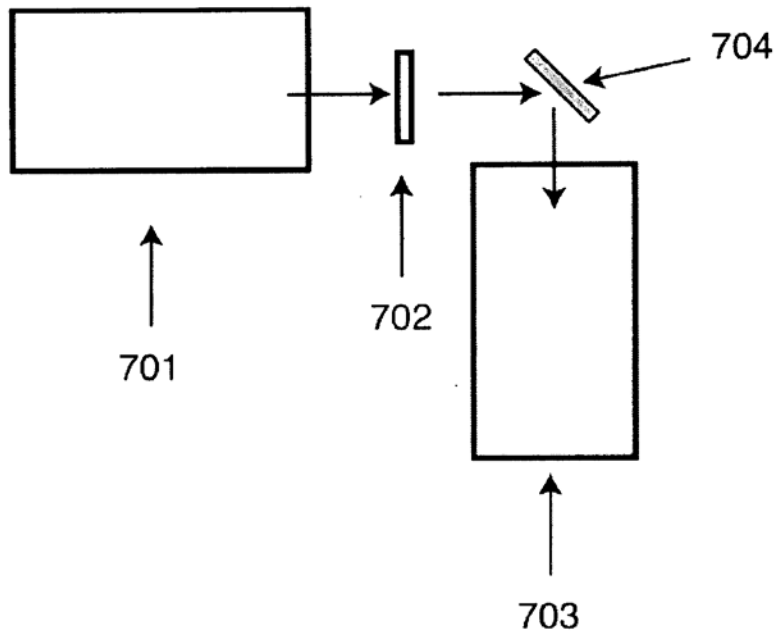


B

Figura 6



A



B

Figura 7

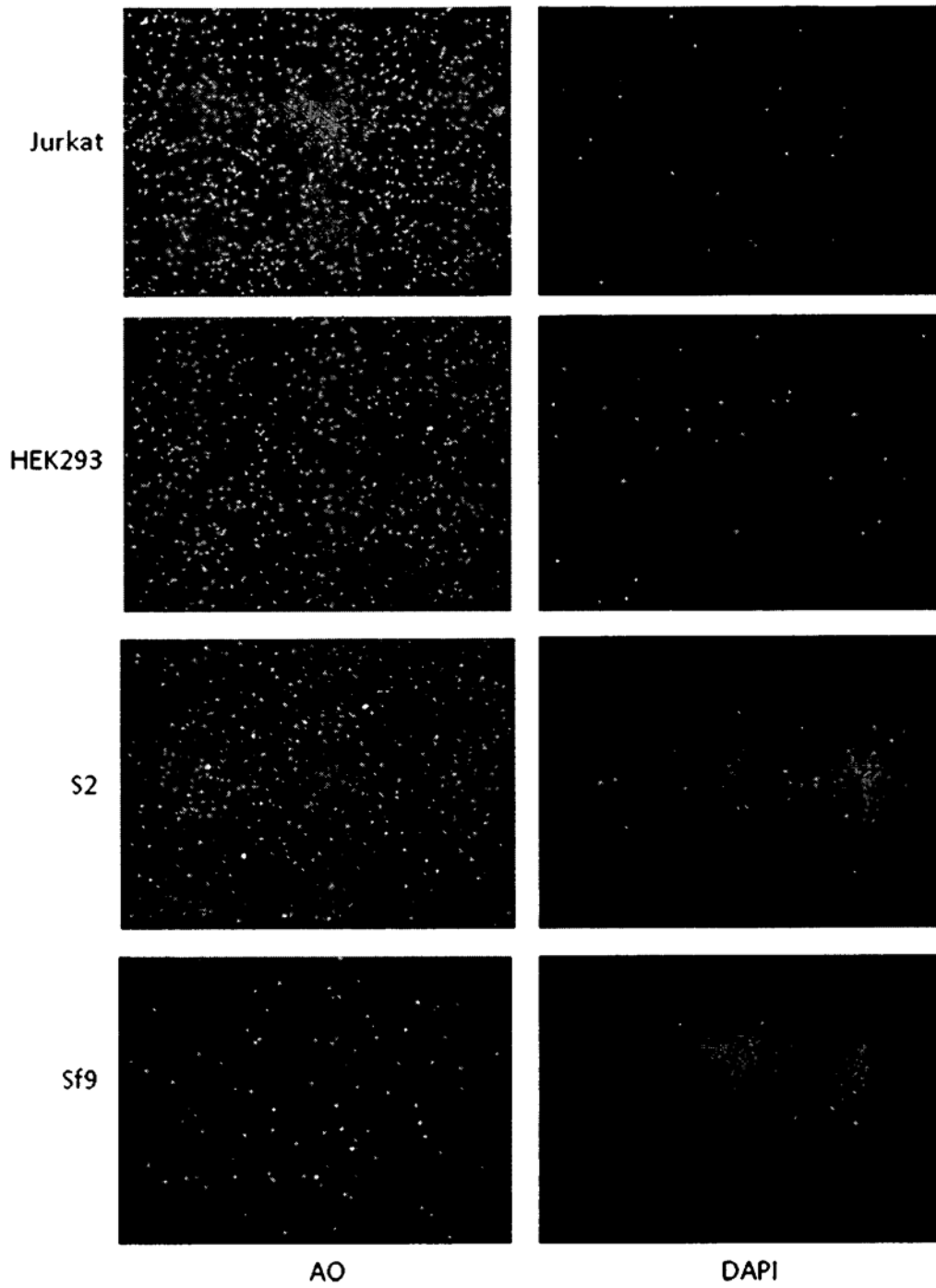
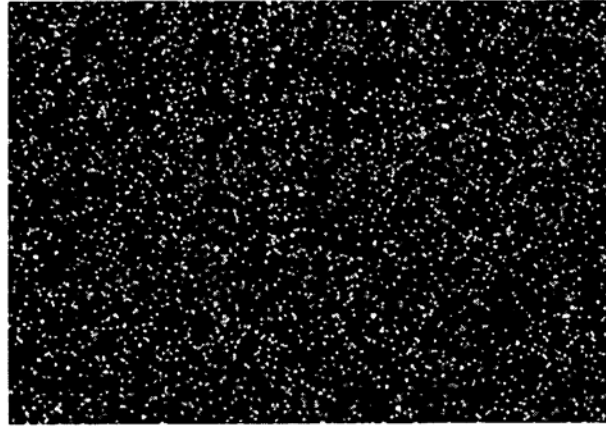
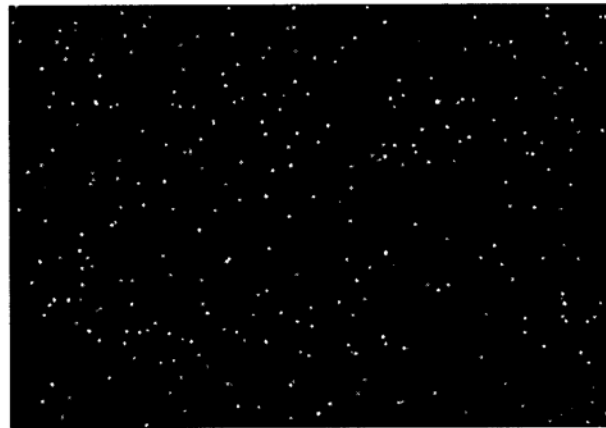


Figura 8A

Jurkat, AO



Jurkat, DAPI



Jurkat, AO (verde) y
DAPI (azul)

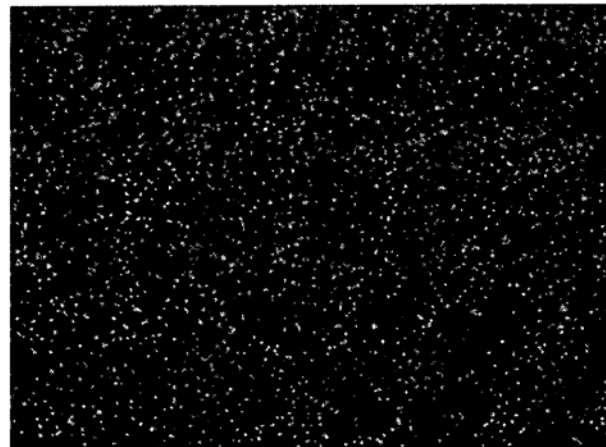
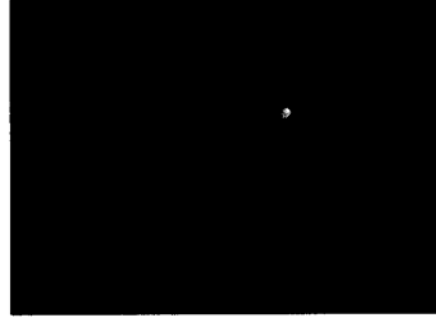
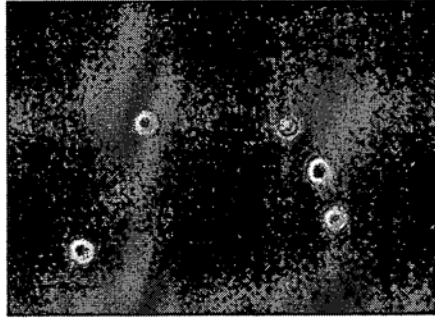
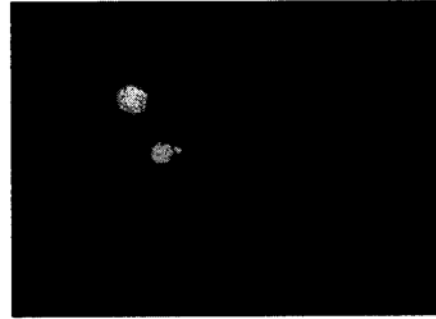
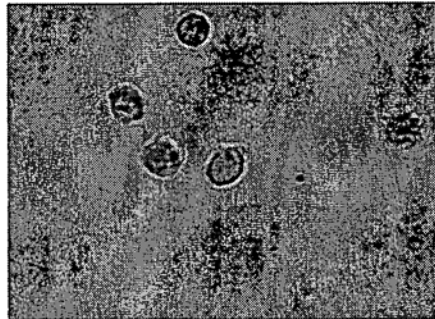


Figura 8B

Jurkat,
ejemplo 1



Jurkat,
ejemplo 2



Contraste de fases

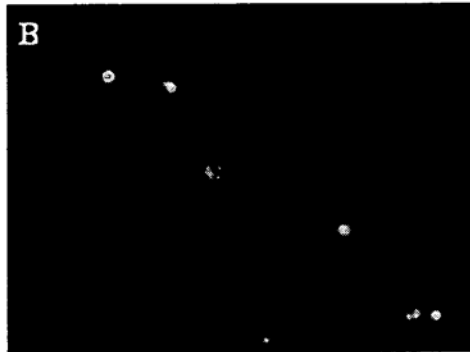
Banda UV (DAPI)

Figura 9

Células Jurkat,
Contraste de fases



Células Jurkat,
Paso largo verde (PI)



Células Jurkat,
Paso de banda UV (DAPI)

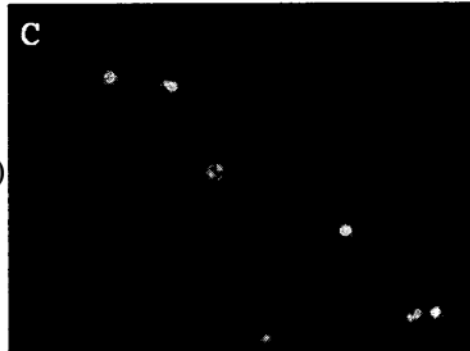


Figura 10

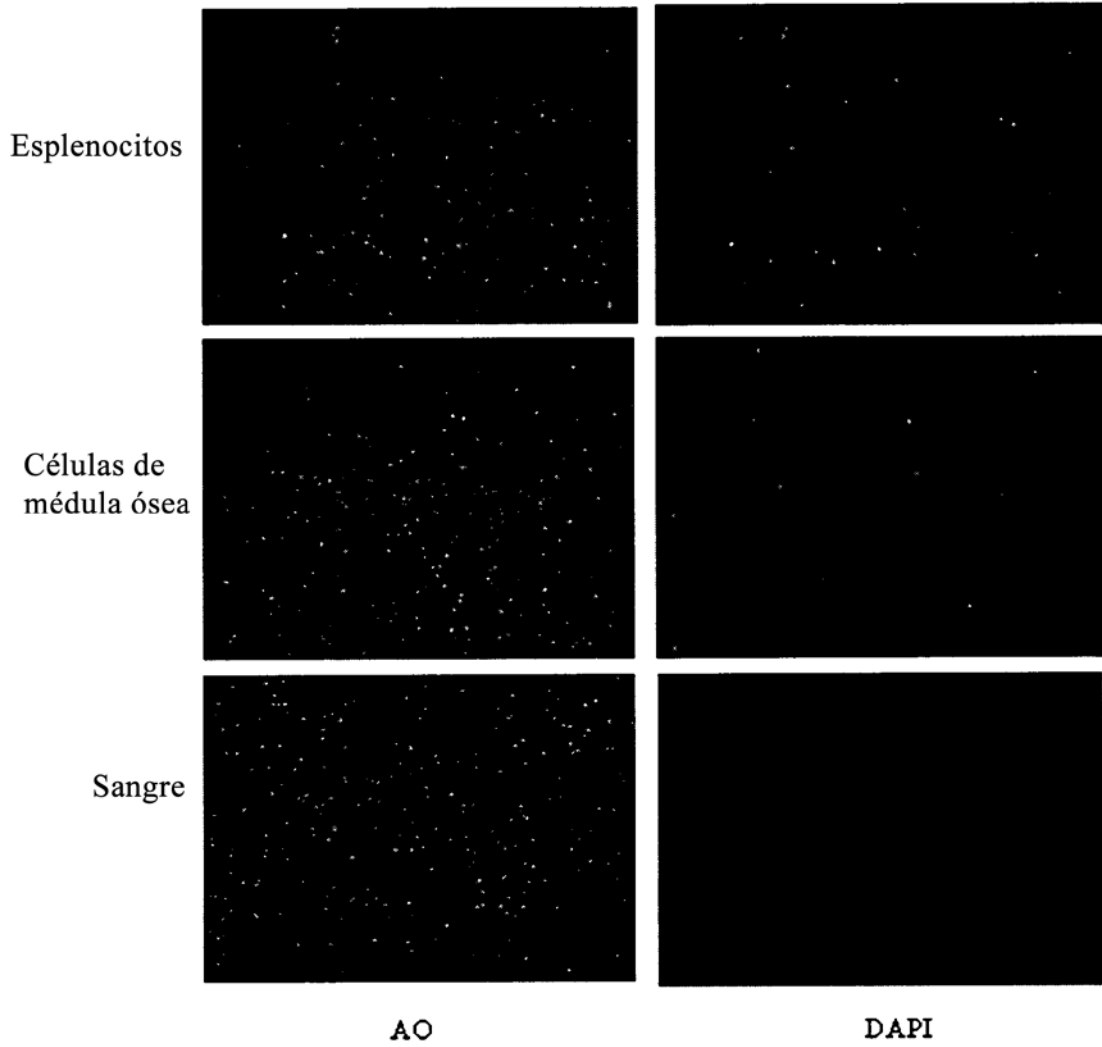


Figura 11

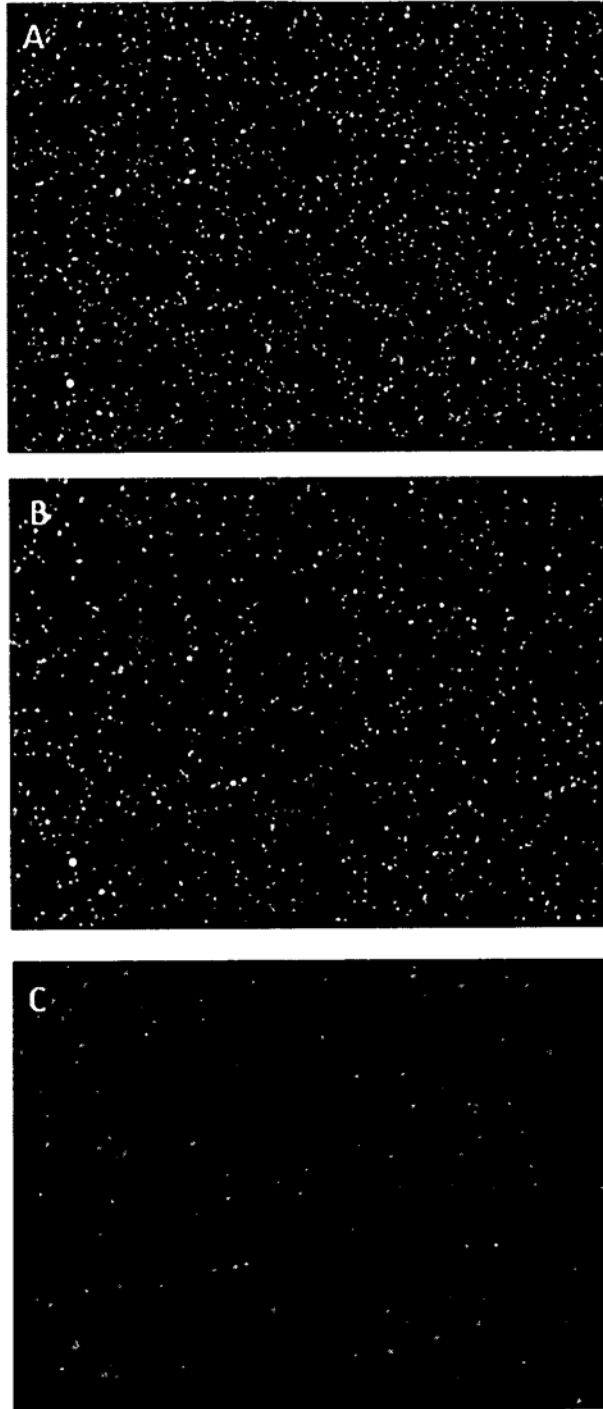


Figura 12

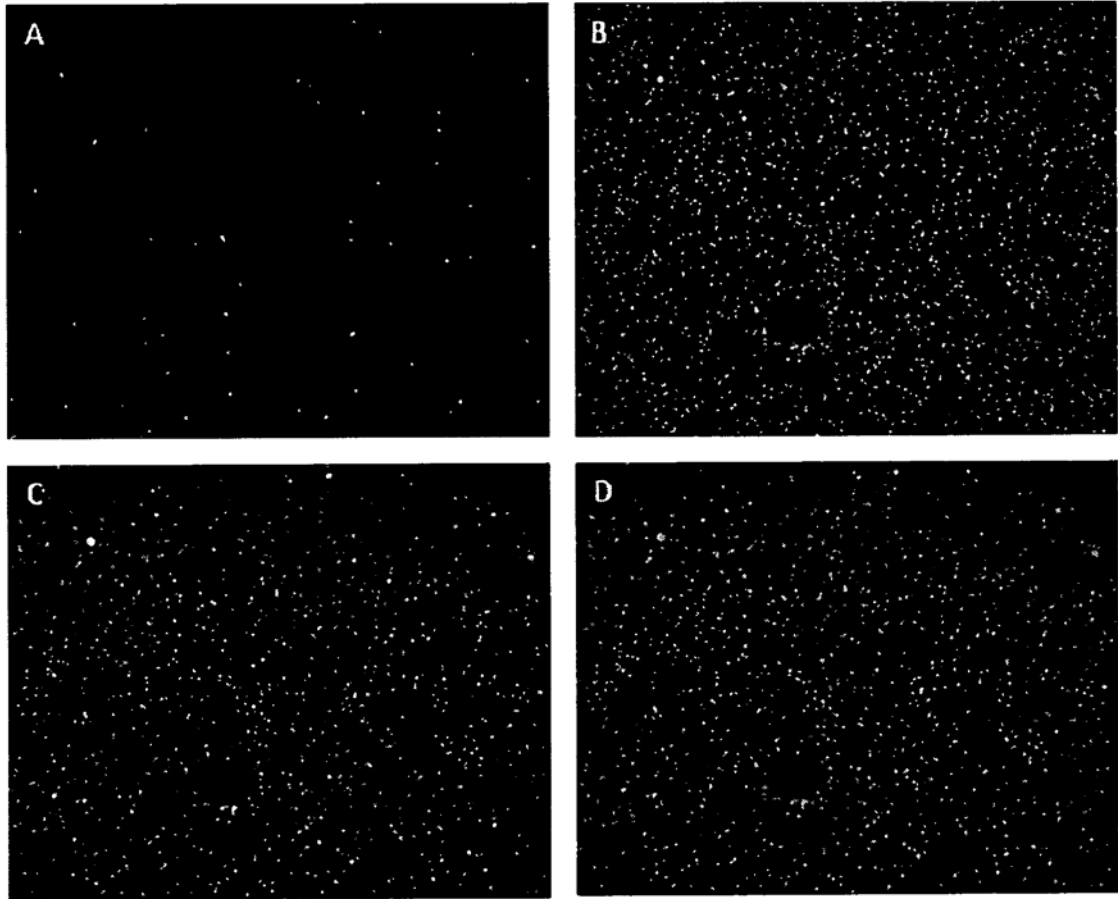


Figura 13

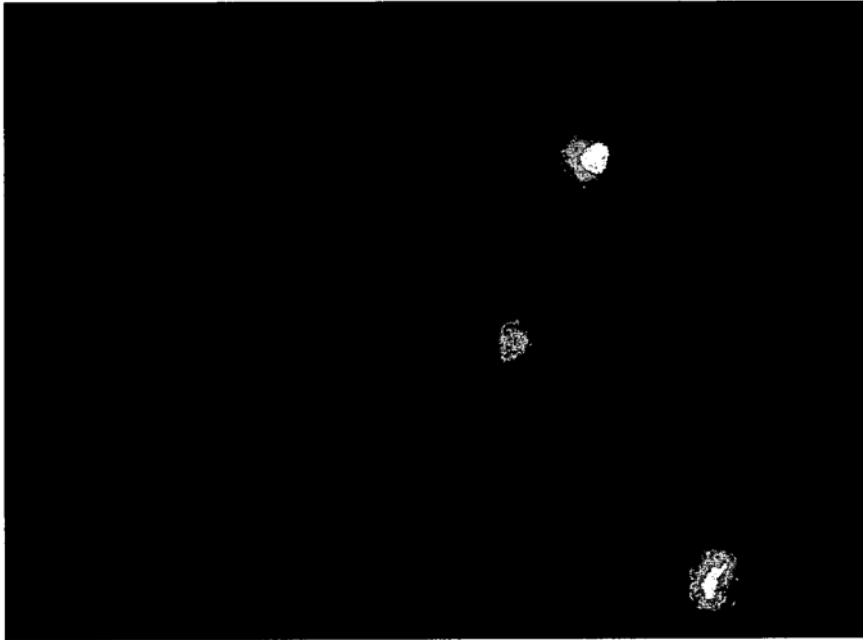
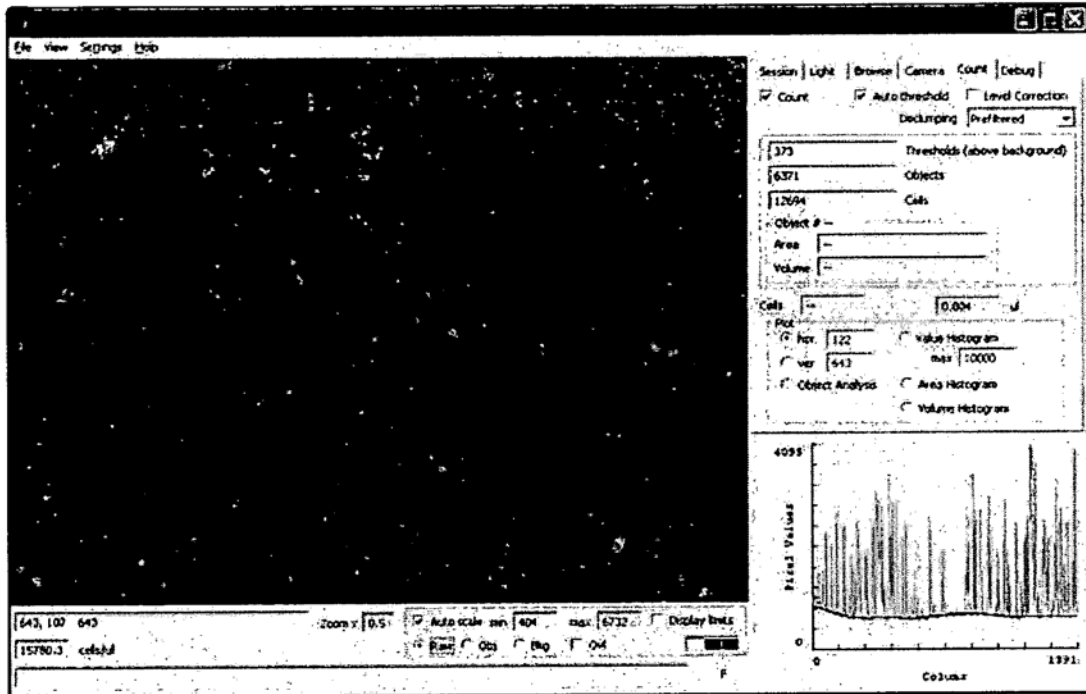
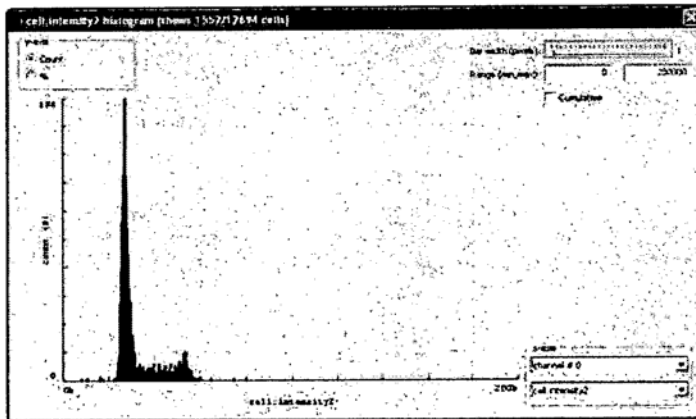


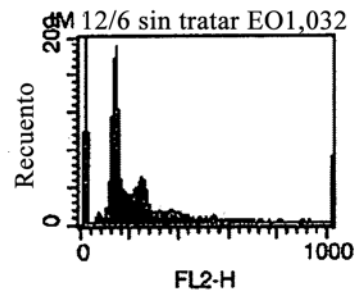
Figura 14



A



B



C

Figura 15

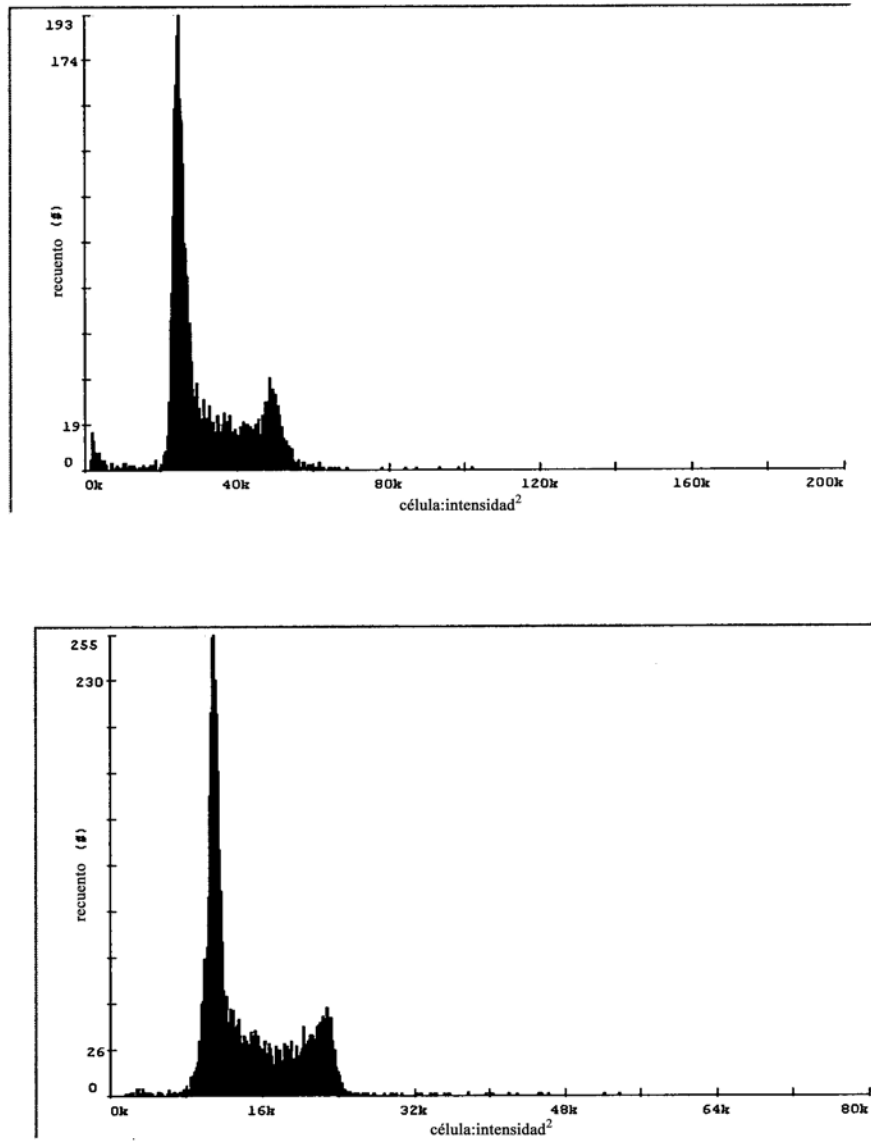


Figura 16

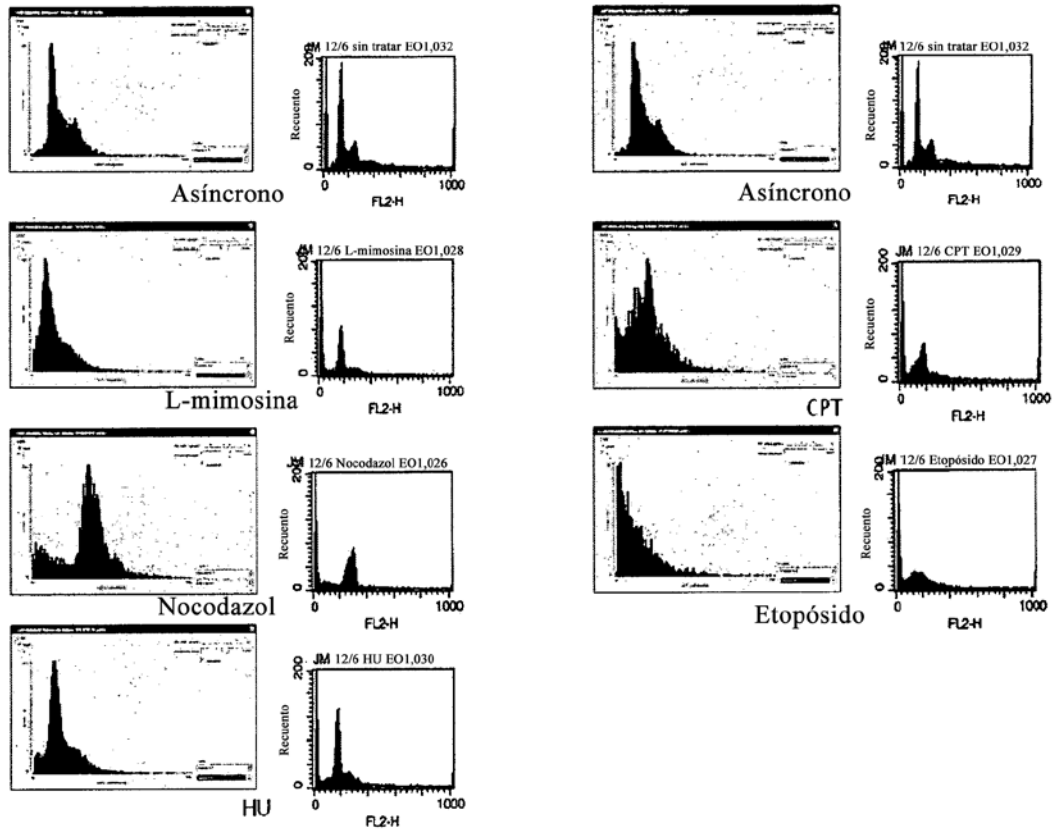


Figura 17

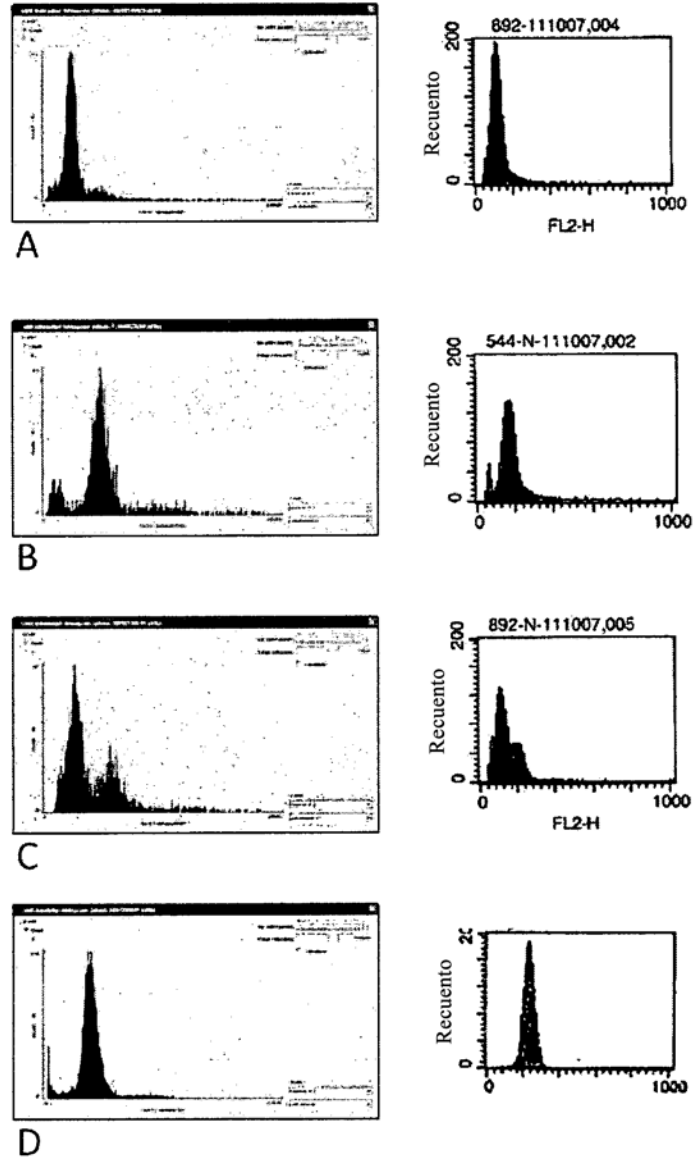


Figura 18

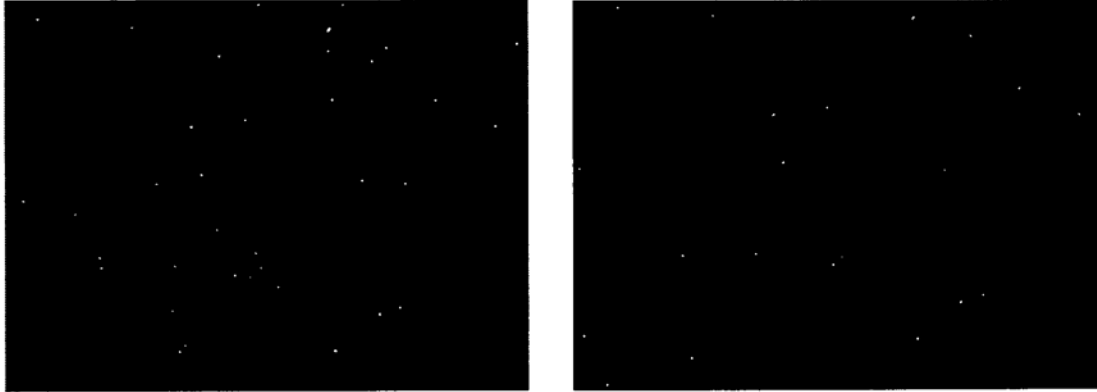
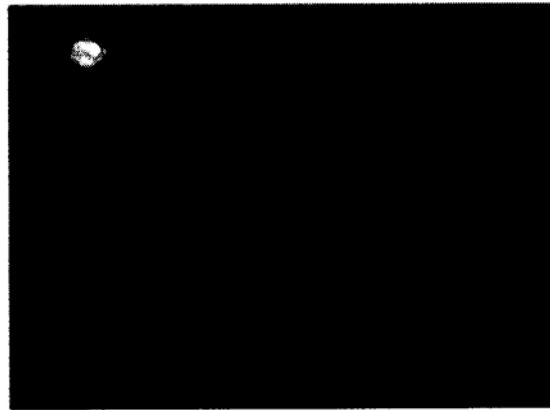
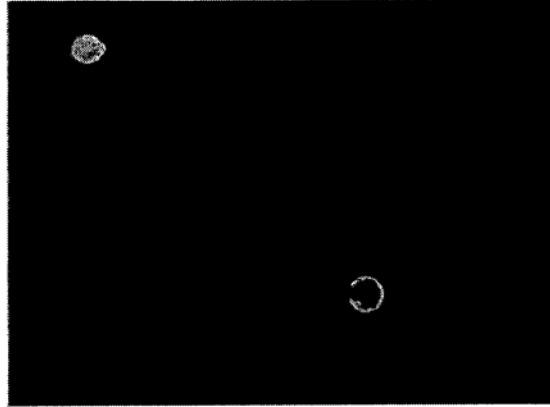


Figura 19

AF488-Anexina V,
banda azul



Contraste de fases

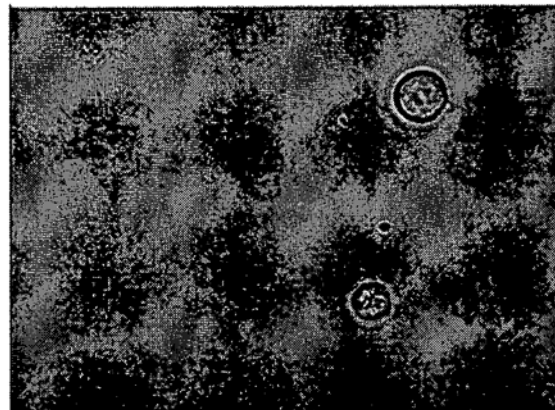


Figura 20

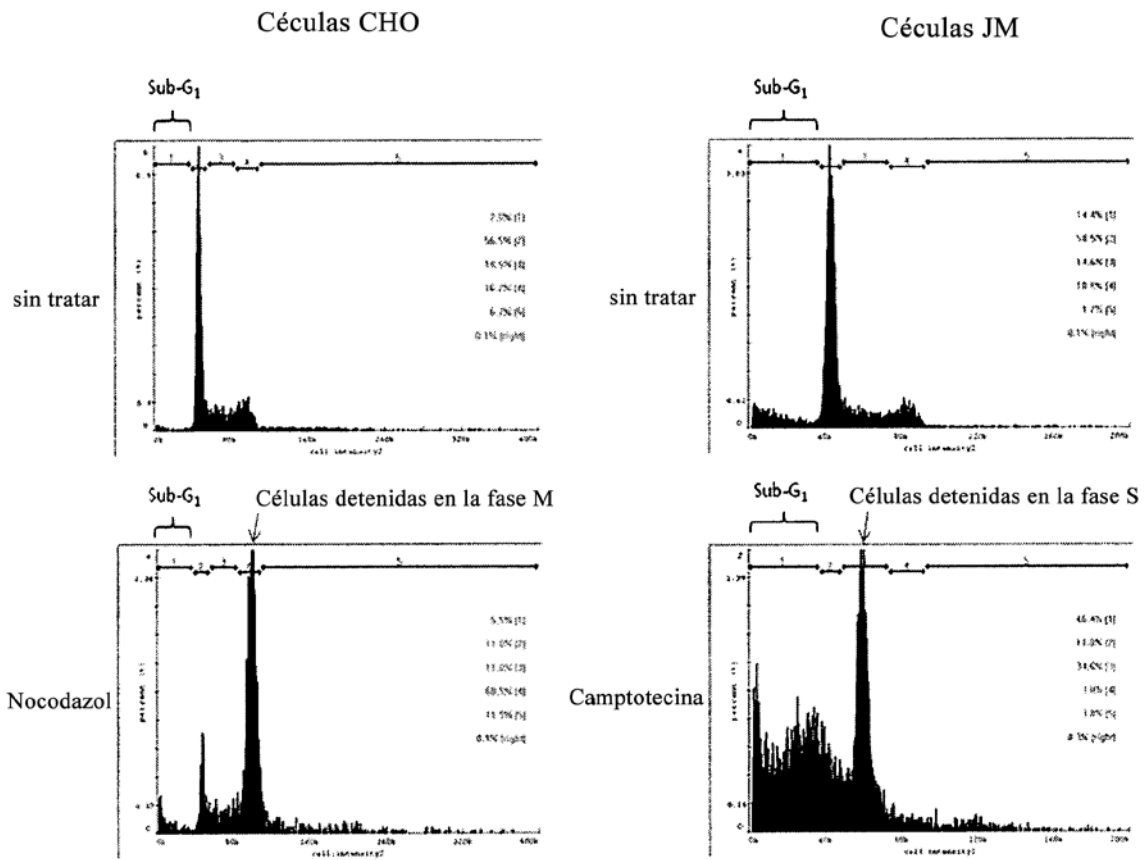
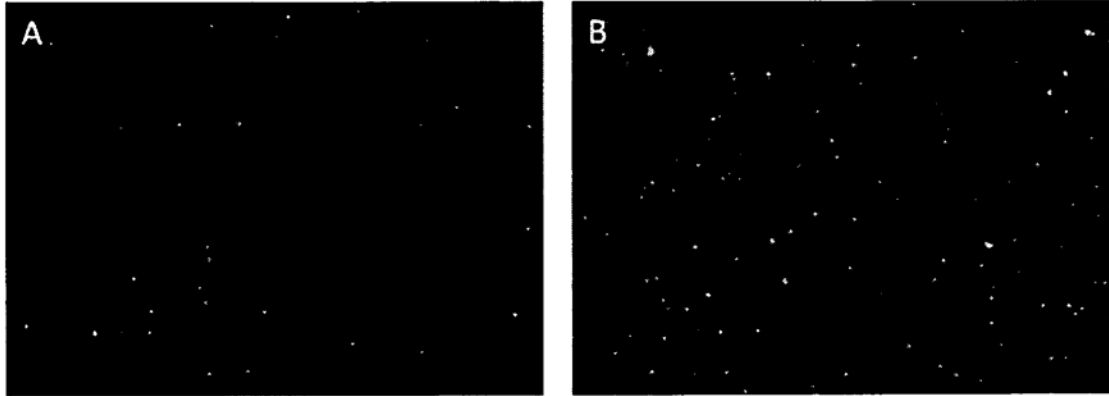


Figura 21



C Resultado - Análisis de anexina V			
#	Descripción	Resultados	Imagen
0	Células anexina V+	7,8 %	Células Jurkat anexina V AF594 - NOC
	Células no viables	5,6 %	
	Células anexina V+	3,25E5 células/mL	
	Células no viables	2,32E5 células/mL	
	Células viables	3,60E6 células/mL	
	Recuento de células totales	4,16E6 células/mL	

D Resultado - Análisis de anexina V			
#	Descripción	Resultados	Imagen
0	Células anexina V+	39,5 %	Células Jurkat anexina V AF594 + NOC
	Células no viables	7,5 %	
	Células anexina V+	4,40E6 células/mL	
	Células no viables	8,37E5 células/mL	
	Células viables	5,91E6 células/mL	
	Recuento de células totales	1,11E7 células/mL	

Figura 22

Superposición
DACM; azul
FLICA; rojo
Verde SYTOX; verde

DACM; azul
(Células viables)

FLICA; rojo
(Células apoptóticas)

Verde SYTOX; verde
(Células no viables)

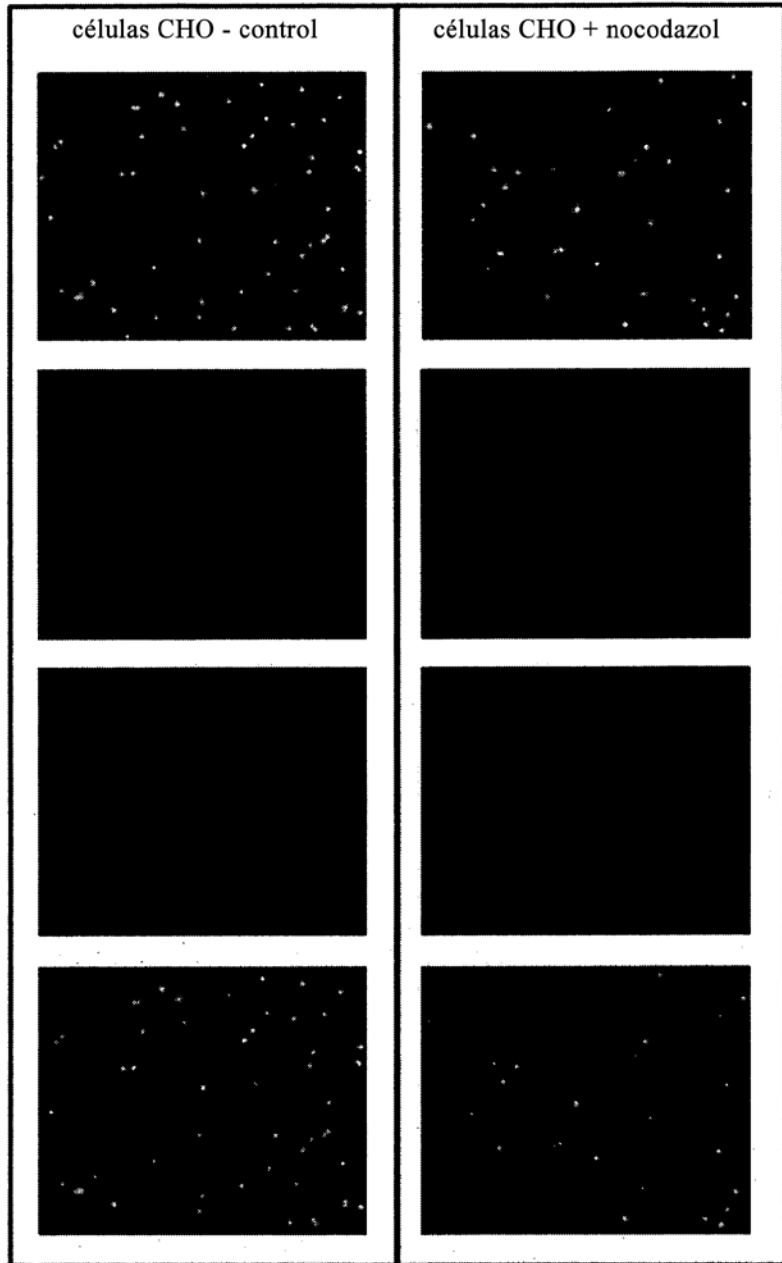


Figura 23

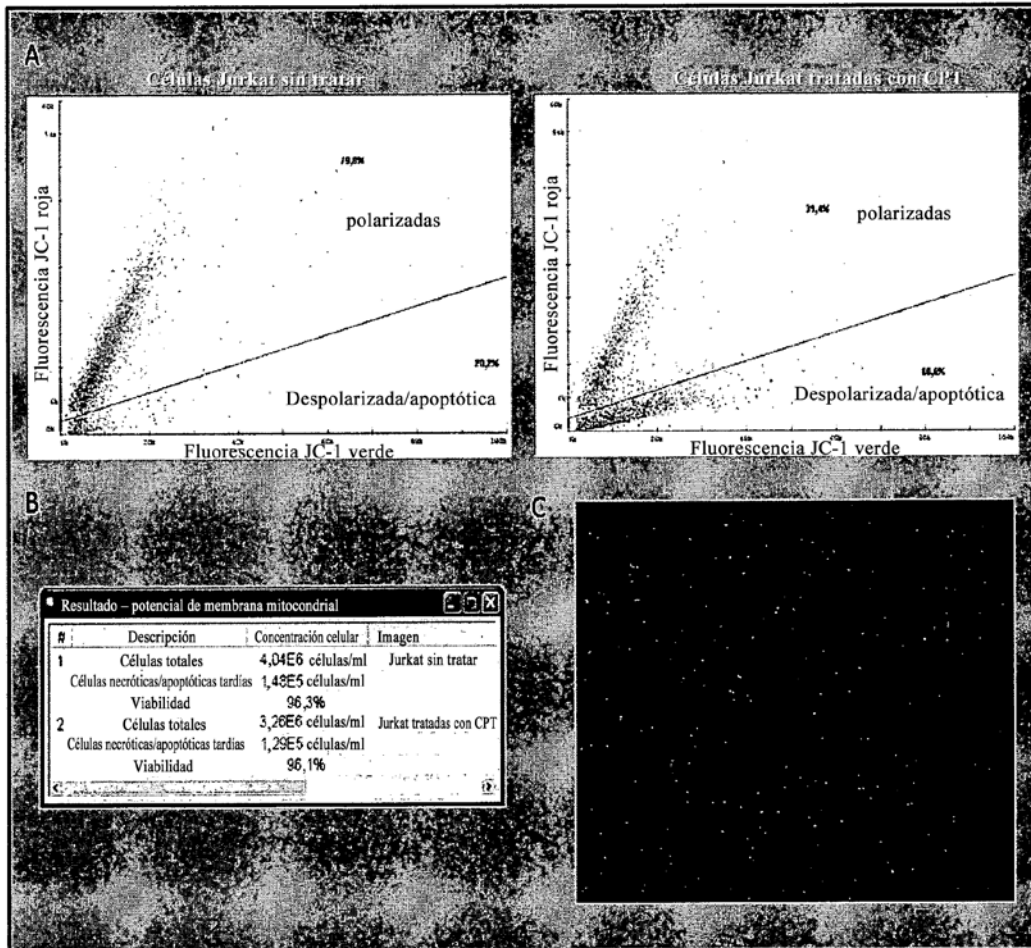


Figura 24

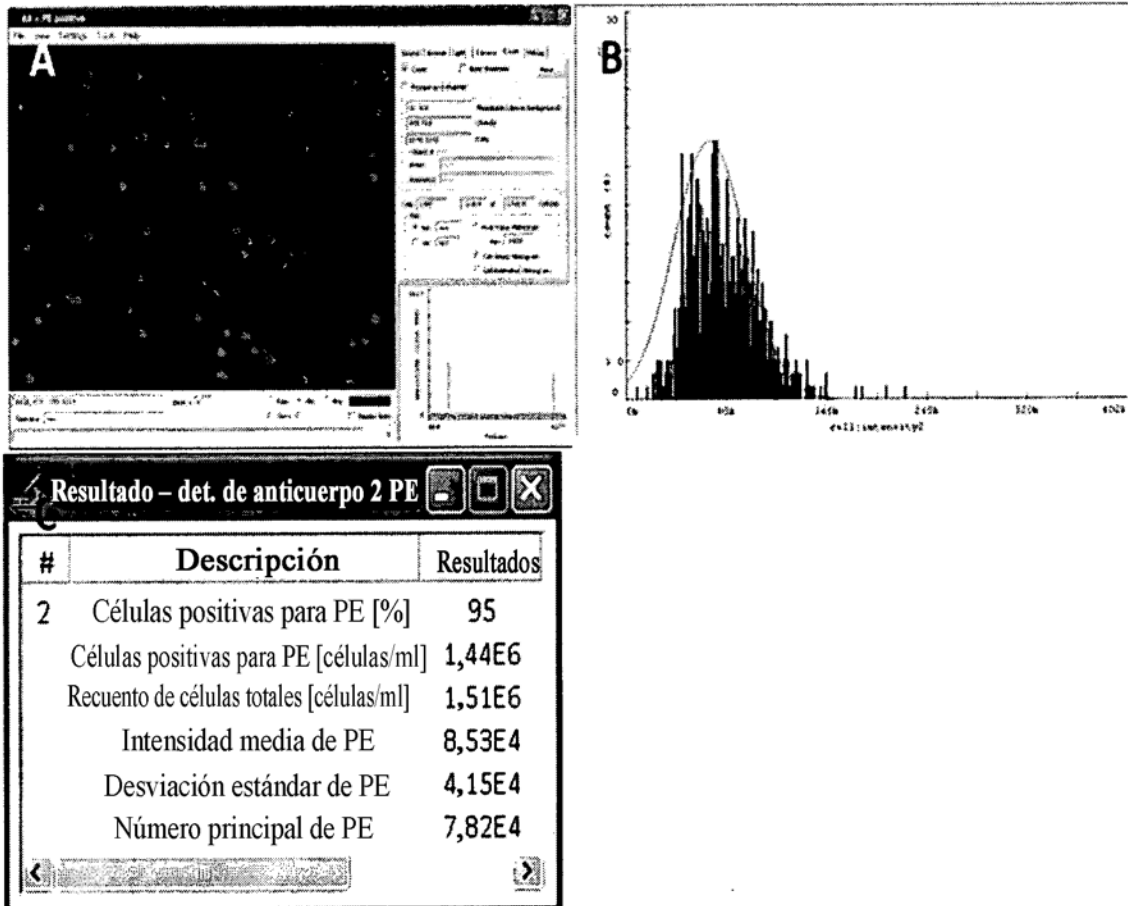


Figura 25