

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 719 588**

51 Int. Cl.:

G01N 21/64 (2006.01)

G01N 21/31 (2006.01)

G01N 21/25 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.05.2003 PCT/EP2003/04916**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.12.2003 WO03100398**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.05.2003 E 03737961 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.01.2019 EP 1511989**

54 Título: **Sistema de medición de fluorescencia**

30 Prioridad:

24.05.2002 DE 10223438

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

11.07.2019

73 Titular/es:

**BAYER INTELLECTUAL PROPERTY GMBH
(100.0%)
Alfred-Nobel-Strasse 10
40789 Monheim, DE**

72 Inventor/es:

**BECHEM, MARTIN y
PAFFHAUSEN, WOLFGANG**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 719 588 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

Sistema de medición de fluorescencia

La invención se refiere a un sistema de medición de fluorescencia que se puede utilizar, por ejemplo, para el cribado de alto rendimiento en el desarrollo de principios activos.

- 5 Un método convencional para comprobar o analizar una sustancia sin contacto consiste en marcar la sustancia con un colorante fluorescente seleccionado. La selección del colorante fluorescente depende en general de la propiedad de la sustancia a investigar. Para este tipo de análisis, la sustancia marcada se ilumina con luz de una longitud de onda o un intervalo de longitud de onda que se ajusta al comportamiento de absorción del colorante fluorescente utilizado (el máximo de la absorción en general). La respuesta del colorante fluorescente comprende la emisión de la
- 10 luz de emisión que es característica del colorante fluorescente y cuya longitud de onda es en general más larga que la de la radiación de excitación. La selección adecuada del colorante fluorescente de marcación permite medir de manera cuantitativa cambios en la propiedad de la sustancia, por ejemplo, la concentración de la sustancia en una solución, sobre la base de cambios en el comportamiento de fluorescencia, por ejemplo, cambios en la intensidad de la fluorescencia y/o de la longitud de onda efectiva de la emisión.
- 15 Una subclase de sustancias es, por ejemplo, las biomoléculas (DNA, proteínas, lípidos) y los fragmentos celulares, las células o los tejidos biológicos o los soportes orgánicos o inorgánicos ("beads" o "microspheres"). En el estado de la técnica es posible el marcado fluorescente de dicho material biológico con técnicas adecuadas.

20 Una técnica convencional en la investigación de principios activos es la utilización de procedimientos de fluorescencia para la evaluación de sustancias de ensayo al teñirse el sistema de ensayo a investigar (biomoléculas y/o células y/o soportes inmovilizados con biomoléculas/células) con un colorante fluorescente adecuado, de modo que mediante la interacción de sustancias de ensayo se pueden medir cuantitativamente los cambios de parámetros. Un ejemplo típico al respecto es la coloración con colorantes fluorescentes sensibles a los iones que están disponibles comercialmente, por ejemplo, para la detección de K⁺, Ca⁺⁺ y sus cambios o también para la detección de cambios en el potencial de membrana o el valor del pH intracelular.

- 25 En este tipo de ensayos se utilizan a menudo células preparadas de manera adecuada y marcadas fluorescentemente en recipientes de reacción pequeños que están disponibles, por lo general, con una superficie aproximada de 108 mm x 72 mm en una disposición de matriz como placas de microtitulación estandarizadas con una superficie básica aproximada de 128 mm x 86 mm en versiones de 96, 384 o 1536 pocillos de ensayo. Las células biológicas crecen a menudo en una solución nutritiva en el fondo de los pocillos de ensayo y forman una
- 30 llamada capa de células que después de una coloración correspondiente se puede excitar de diversas maneras para la emisión de fluorescencia. Un método estándar automatizado consiste en la evaluación de una placa de microtitulación por medio de lectores comerciales de placas de microtitulación con una geometría fija de medición de excitación de colorante fluorescente y de emisión. Para una evaluación amplia y completa, la placa de microtitulación se transporta de manera electromecánica y secuencial, pocillo por pocillo, hacia la posición de excitación/medición.
- 35 Hay sistemas de medición con geometrías de iluminación diferentes para la excitación y la medición perpendicular de la fluorescencia desde arriba o a través del fondo transparente de placas de microtitulación desde abajo, como se describe, por ejemplo en el documento DE19720667A1 (o en paralelo en el documento US5,933,232).

40 Dado que en el cribado de alto rendimiento para la investigación de principios activos se debe analizar en el menor tiempo posible la acción de algunos millones de sustancias químicas, una premisa esencial para este alto rendimiento es una alta velocidad de medición. En el caso de los lectores de fluorescencia convencionales, el movimiento mecánico de la placa resulta un obstáculo en este sentido. Los tiempos de medición para una placa de microtitulación con 1536 pocillos de ensayo, que se han de mover individualmente, se sitúan en el intervalo de minutos. Los sistemas de escaneado por láser, más complejos desde el punto de vista técnico, funcionan claramente con una mayor rapidez (K. Schroeder e.a.: FLIPR: A New Instrument for Accurate, High Throughput

45 Optical Screening; J. of. Biomolecular Screening, Voll, número 2, 1996; US5,355,215). En tales sistemas, las células en todos los pocillos de ensayo de una placa de microtitulación se excitan mediante un rayo láser de manera secuencial, pero aproximadamente al mismo tiempo debido una guía de rayo muy rápida para la emisión de fluorescencia. Mediante el escaneado con ayuda de espejos de desviación rotatorios se obtiene una excitación casi bidimensional de los objetos, cuya fluorescencia se detecta con un sensor de imagen integrado. Un sistema de

50 diafragma minimiza una posible fluorescencia de fondo. A pesar o debido al corto tiempo de permanencia del láser, la intensidad de la radiación local es, sin embargo, muy alta, por lo que existe el peligro de un blanqueamiento de los colorantes fluorescentes, que no son en general muy sólidos a la luz, y de una mala interpretación, por tanto, de los valores de medición. El sistema está limitado además por el número de longitudes de onda de excitación del láser. Así, por ejemplo, el láser de ión de argón convencional con su máximo de excitación a 488 nm apenas posibilita una

55 excitación en el intervalo próximo a UV, por ejemplo, a 360 nm. Un cambio del láser es complicado; un enfriamiento (por agua) necesario a menudo resulta costoso. El ajuste de la óptica es difícil para una aplicación rutinaria y solo puede ser ejecutado por personal especializado; el sistema mecánico (espejos de desviación rotatorios) es potencialmente propenso a fallos.

En muchos casos, los pocillos de ensayo individuales de una placa de microtitulación contienen aún en el

5 sobrenadante de las células el colorante fluorescente, con las que se tiñeron. Esto resulta en parte absolutamente necesario (por ejemplo, en el caso de colorantes dispersos para medir el potencial de membrana); sin embargo, resulta problemático también un proceso de lavado, en el que se produce un blanqueamiento del colorante residual por dilución. Durante un proceso de lavado no se puede garantizar que la capa de células no se dañe o que las células no cambien su funcionalidad biológica solamente por la dinámica de flujo durante la aspiración y que esto no altere los resultados de medición. Una etapa de lavado adicional disminuye también claramente el rendimiento de las muestras.

10 En los sistemas de medición de fluorescencia convencionales resulta muy desventajosa su geometría de iluminación, en la que la muestra se excita en perpendicular desde abajo o desde arriba. Si el sobrenadante de las células contiene aún colorante fluorescente, como se describe arriba, con el procedimiento de excitación mencionado y debido a la columna de líquido excitado en el sobrenadante, la señal de fondo representa un múltiplo del cambio de fluorescencia celular que resulta de la interacción de una sustancia de ensayo con las células. Esto se debe a que la monocapa de células marcadas fluorescentemente tiene en general solo un grosor de 10 μm , pero el nivel de sobrenadante asciende a varios milímetros, lo que hace inevitable una alteración de los resultados de medición.

15 El documento US5,854,684 da a conocer la iluminación desde arriba de un sustrato planar mediante dos fuentes de luz dispuestas simétricamente en un ángulo $<90^\circ$ y la detección de la luz reflejada en el sustrato planar mediante una cámara situada en perpendicular sobre el sustrato planar. Esta disposición de medición no es adecuada para placas de microtitulación, porque se pueden producir efectos de sombra debido a la profundidad de los pocillos de ensayo de la placa de microtitulación en esta disposición.

20 El documento EP0751393A da a conocer la iluminación de una placa de microtitulación a través del fondo transparente. La iluminación se lleva a cabo mediante dos conjuntos de fuentes de luz provistas en cada caso de filtros de dispersión para conseguir una iluminación homogénea del fondo de la placa de microtitulación. Adicionalmente, el depósito, en el que se encuentran las fuentes de luz y el sistema detector, está provisto de superficies de gran dispersión. Esta disposición de iluminación provoca que porcentajes esenciales de la luz de excitación lleguen a los pocillos de ensayo en un ángulo de apertura superior a 30° y que se produzca, por tanto, una alteración de los resultados de medición debido a la excitación del sobrenadante en los pocillos de ensayo.

25 El documento DE19914279C da a conocer una disposición para la lectura óptica de la información de un sustrato en forma de matriz con una pluralidad de muestras individuales. Sin embargo, en el caso del sustrato no se trata de placas de microtitulación. Tampoco se dan a conocer una iluminación y una detección a través del fondo del soporte de muestras ni fuentes de iluminación lineales, dispuestas en lados opuestos entre sí de una placa de microtitulación.

30 El documento US6,362,006B1 da a conocer la iluminación de una placa de microtitulación mediante dos fuentes de radiación dispuestas simétricamente en un ángulo $<90^\circ$ respecto a la placa de microtitulación y la detección de la luz reflejada en la placa de microtitulación en un detector dispuesto en perpendicular sobre la placa de microtitulación. Esta disposición de medición tiene la desventaja de que se pueden producir efectos de sombra y, por tanto, una iluminación no uniforme de las muestras situadas en el fondo de los pocillos de ensayo.

35 Por tanto, para el análisis de fluorescencia cuantitativo resultó necesario un procedimiento de excitación superficial homogéneo novedoso que cumple los siguientes requisitos:

- 40
- excitación de un colorante fluorescente al menos en el intervalo UV-VIS (220 nm a 800 nm) en longitudes de onda efectivas seleccionables libremente;
 - minimización de señales de fondo parásitas mediante la geometría de iluminación especial;
 - aumento de la velocidad de medición mediante la excitación paralela, es decir, simultánea, de todas las muestras distribuidas en la superficie de medición y el procesamiento paralelo con procedimientos de detección generadores de imagen (en comparación con la medición secuencial);
- 45
- evitación de efectos de blanqueamiento mediante la potencia de radiación mínima local;
 - exclusión de componentes movidos mecánicamente;
 - evitación de reajustes ópticos complejos después de instalarse el sistema;
 - sensibilidad de detección comparable con los sistemas de medición de fluorescencia convencionales.

50 El objetivo según la invención se consigue mediante un sistema de medición de fluorescencia con las características de la reivindicación 1.

El sistema detector está dispuesto en la posición esencialmente horizontal de la placa de microtitulación por debajo de la placa de microtitulación.

55 La placa de microtitulación tiene usualmente formatos de 96, 384 o 1536 pocillos de ensayo. La placa de microtitulación es transparente.

La iluminación del fondo transparente de la placa de microtitulación se realiza preferentemente con una homogeneidad de $\pm 20\%$, preferentemente $\pm 10\%$. Tal homogeneidad se puede conseguir al estar dispuesta

respectivamente una de las fuentes de iluminación lineales en cada uno de los dos lados opuestos entre sí de la placa de microtitulación. Cada una de las fuentes de iluminación lineales ilumina la zona, más próxima a la misma, del fondo de la placa de microtitulación con una intensidad superior a la zona más alejada, porque la intensidad I de la luz de excitación disminuye con $I \sim 1/R^2$ con la distancia creciente R de la fuente de iluminación. Como resultado de la disposición geométrica, es decir, simétrica, según la invención de las fuentes de iluminación, la intensidad de la iluminación es esencialmente constante en todo el fondo de la placa de microtitulación. Las dos fuentes de iluminación lineales se disponen preferentemente en cada uno de los dos lados longitudinales de una placa de microtitulación rectangular. No obstante, puede haber también, por ejemplo, cuatro fuentes de iluminación dispuestas en cada caso simétricamente por pares en cuatros lados distintos de la placa de microtitulación, de modo que las intensidades de iluminación de las cuatro fuentes de iluminación se superponen y la intensidad de iluminación es esencialmente constante en todo el fondo de la placa de microtitulación.

Las fuentes de iluminación lineales pueden estar configuradas como barras halógenas lineales, como tubos fluorescentes o como tiras LED. Sin embargo, las fuentes de iluminación lineales son preferentemente fibras ópticas dispuestas linealmente que se pueden situar en una disposición especial a partir de un haz de fibras redondo para formar un llamado convertidor de sección transversal de fibras. Las fibras ópticas pueden estar fabricadas de material de polímero especial, tal como PMMA (polimetilmetacrilato) o PC (policarbonato), o de vidrio estándar o vidrio de cuarzo y son adecuadas en el intervalo de diámetro de 5 μm a 2 mm aproximadamente. A fin de compensar inhomogeneidades de la radiación luminosa en el lado de entrada del conductor de luz, las fibras del convertidor de sección transversal deberán estar mezcladas de manera aleatoria.

Las fuentes de iluminación lineales emiten una longitud de onda que corresponde a la onda de longitud de excitación para una excitación de fluorescencia de las muestras en los pocillos de ensayo de la placa de microtitulación. Las fuentes de iluminación pueden emitir luz de color o luz blanca, filtrada de manera correspondientes, por ejemplo, al alimentarse la luz de lámparas correspondientes en el lado de entrada al convertidor de sección transversal de fibras y al monocromatizarse mediante filtros, preferentemente filtros de interferencia. Por consiguiente, las fuentes de iluminación pueden emitir también la luz de lámparas de destello para la excitación pulsada o lámparas UV para la excitación de fluorescencia en el intervalo UV (220 a 400 nm). Asimismo, al convertidor de sección transversal se puede acoplar un láser de radiación continua con óptica de expansión correspondiente adaptada a la apertura numérica de la óptica de fibras. Con un láser pulsado en la misma disposición resulta posible la medición de fluorescencia en tiempo retardado que genera imágenes (TRF). La vida útil, corta en general, de la fluorescencia del fondo de interferencia puede mejorar drásticamente con una duración correspondiente de la señal útil la proporción de señal y ruido.

El sistema detector puede comprender un detector generador de imagen, tal como un sistema de medición por vídeo, que presenta preferentemente un intensificador de luz residual. El intensificador de luz residual puede presentar un dispositivo de gating que puede servir para hacer sensible la cámara a la señal útil en el intervalo de nanosegundos solo después de un pulso de excitación de láser corto (orden de magnitud de picosegundos).

Entre la placa de microtitulación y el sistema detector pueden estar dispuestos uno o varios filtros que seleccionan la luz fluorescente antes de la detección. Varios filtros, que se deben utilizar alternativamente, pueden estar dispuestos en un cambiador de filtros.

El sistema de medición de fluorescencia puede presentar también uno o varios espejos dicróicos entre la placa de microtitulación y el sistema detector, mediante los que la luz fluorescente procedente de la placa de microtitulación se divide en dos o varias longitudes de onda y se desacopla y se detecta de manera selectiva.

La ventaja del sistema de medición de fluorescencia según la invención radica en que una placa de microtitulación se ilumina en total simultáneamente y no solo la zona de núcleo de cada pocillo de ensayo.

El sistema de medición de fluorescencia según la invención se puede ajustar del intervalo UV al intervalo próximo de infrarrojos (220 a 800 nm) mediante una selección adecuada de fuentes de luz de excitación y filtros.

Debido a la medición simultánea y paralela de todos los pocillos de ensayo, el sistema de medición de fluorescencia según la invención es adecuado en particular para mediciones cinéticas que se pueden ejecutar al mismo tiempo en todos los pocillos de ensayo mediante el sistema de medición de fluorescencia según la invención y que implican, por tanto, un gran ahorro de tiempo respecto a mediciones cinéticas con sistemas convencionales.

Figuras y ejemplos

Las figuras muestran:

Fig. 1 el principio de la excitación homogénea;

Fig. 2 la sección transversal de un convertidor de sección transversal de fibras de vidrio;

Fig. 3 la estructura de un sistema de medición de fluorescencia;

Fig. 4 el sistema de iluminación con dos convertidores de sección transversal;

Fig. 5 los resultados de medición en una placa de microtitulación con 1536 pocillos de ensayo; y

Fig. 6 la medición de resolución local de la emisión de fluorescencia desde los pocillos de ensayo de una placa

de microtitulación con 384 pocillos de ensayo mediante el sistema de medición de fluorescencia según la invención.

5 La figura 1 muestra cómo se consigue una iluminación homogénea de una placa de microtitulación 1 mediante dos fuentes de iluminación 3. La placa de microtitulación 1 con los pocillos de ensayo 2 se ilumina desde abajo mediante las dos fuentes de iluminación 3 dispuestas simétricamente. El volumen 4 de los pocillos de ensayo 2, iluminados mediante las fuentes de iluminación 3, está teñido de oscuro y es esencialmente constante para todos los pocillos de ensayo 2.

10 La figura 2 muestra una sección transversal de un convertidor de sección transversal de fibras 21. La luz de excitación se alimenta mediante el haz de fibra óptica 22. En el convertidor de sección transversal 21, las fibras ópticas del haz 22 se reordenan en una tira de fibras 23 que se extiende linealmente. La anchura de la tira se obtiene a partir del diámetro de haz de entrada y es de 1 mm aproximadamente en caso de una longitud de 150 mm y una sección transversal de entrada de 15 mm aproximadamente. La luz irradiada 24 presenta usualmente, por ejemplo, en el caso de un convertidor de sección transversal de fibras de vidrio, un ángulo de apertura α de 30° aproximadamente, lo que corresponde a una apertura de $0,5 = \sin \alpha/2$.

15 La figura 3 muestra la estructura de un sistema de medición de fluorescencia. El sistema de medición de fluorescencia está compuesto de una carcasa 330 con una tapa 340. En la tapa 340 hay una entalladura, sobre la que está posicionada una placa de microtitulación 31 de tal modo que la misma se puede irradiar desde el interior de la carcasa 330. En el interior de la carcasa 330 se encuentran los demás componentes del sistema de medición de fluorescencia. La placa de microtitulación 31 con la superficie de base de aproximadamente 128 mm x 86 mm y placa de fondo transparente 360 se irradia con la luz de irradiación 33 mediante dos convertidores de sección transversal de fibras de vidrio en un ángulo de 25° aproximadamente a través de la placa de fondo 360. Los dos convertidores de sección transversal de fibras de vidrio están dispuestos a lo largo de los lados longitudinales de 128 mm de la placa de microtitulación 31. La luz fluorescente 34, emitida a través de la placa de fondo 360 de la placa de microtitulación 31, se desvía mediante el espejo dicróico 35 y una lente 39 hacia una cámara CCD integrada 350. Entre el espejo dicróico 35 y la lente 39 está situado un filtro de interferencia 36, dispuesto en una rueda de filtro 37. La rueda de filtro 37 puede rotar con ayuda de un motor 38.

30 La figura 4 muestra un sistema de iluminación con dos convertidores de sección transversal de fibras 41. La luz de entrada para las fibras se produce con una unidad de lámpara 46. Una corredera de filtro 45 permite filtrar luz con una longitud de onda diferente a partir del espectro de excitación de la unidad de lámpara 46. En el tramo de mezcla de fibras 44, las fibras ópticas se mezclan de manera aleatoria y se dividen en dos ramales 47 en la pieza de distribución 43. En el extremo de los ramales 47 se encuentran los convertidores de sección transversal de fibras 41 con las superficies de salida de fibras 42 dispuestas linealmente.

35 La figura 5 muestra un ejemplo para la medición de la emisión de fluorescencia a partir de los pocillos de ensayo de una placa de microtitulación con 1536 pocillos de ensayo mediante el sistema de medición de fluorescencia según la invención. En todos los pocillos de ensayo se encuentra la misma solución fluorescente. Como resultado de la iluminación homogénea se obtiene una imagen de la placa de microtitulación, en la que la emisión de todos los pocillos de ensayo tiene una luminosidad uniforme dentro de las tolerancias predefinidas.

40 La figura 6 muestra un ejemplo de una medición de resolución local de la emisión de fluorescencia a partir de los pocillos de ensayo de una placa de microtitulación con 384 pocillos de ensayo (24 x 16 pocillos) mediante el procedimiento de medición de fluorescencia según la invención. En cada pocillo de ensayo se encuentran distintos clones de células que expresan de manera diferente una proteína fluorescente, la llamada GFP (green fluorescent protein, proteína verde fluorescente). Se busca el clon con la mejor expresión. Es evidente que el valor promedio de un pocillo de ensayo (principio: lector de fluorescencia) proporciona informaciones/datos falsos, porque aquellas células, que emiten una fluorescencia especialmente clara, o sea, muestran una buena expresión, se identifican dentro de un pocillo de ensayo solo mediante la resolución local.

REIVINDICACIONES

1. Sistema de medición de fluorescencia que presenta una placa de microtitulación (1, 31) y fuentes de iluminación para excitar la fluorescencia de muestras en los pocillos de ensayo (2) a través del fondo transparente de la placa de microtitulación (1, 31) y un sistema detector (350) para la luz fluorescente procedente de los pocillos de ensayo (2) de la placa de microtitulación (1, 31), que está dispuesto por debajo de la placa de microtitulación (1, 31) de tal modo que detecta una emisión de fluorescencia a partir de los pocillos de ensayo (2) de la placa de microtitulación (1, 31) en un ángulo por fuera del intervalo de reflexión de la luz de excitación de las fuentes de iluminación, **caracterizado porque** las fuentes de iluminación son fuentes de iluminación lineales (3, 21, 32, 41) y están dispuestas respectivamente en lados opuestos de la placa de microtitulación (1, 31) y por que el fondo transparente (360) de la placa de microtitulación (1, 31) se ilumina de manera homogénea directamente o mediante espejos de desviación en un ángulo de apertura de $\leq 30^\circ$.
2. Sistema de medición de fluorescencia de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** la emisión de fluorescencia a partir de los pocillos de ensayo (2) de la placa de microtitulación (1, 31) se detecta en un ángulo en el intervalo de 80° a 100° , de manera particularmente preferida en el intervalo de 90° , respecto al plano de extensión de la placa de microtitulación (1, 31).
3. Sistema de medición de fluorescencia de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, **caracterizado porque** la placa de microtitulación (1, 31) presenta 96, 384 o 1536 pocillos de ensayo (2).
4. Sistema de medición de fluorescencia de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado porque** están presentes dos fuentes de iluminación lineales (3, 21, 32, 41) y una fuente de iluminación lineal (3, 21, 32, 41) está dispuesta respectivamente en cada uno de los dos lados longitudinales de un dispositivo receptor de muestras rectangular (1, 31).
5. Sistema de medición de fluorescencia de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado porque** están presentes dos fuentes de iluminación lineales (3, 21, 32, 41) que están dispuestas en cada caso simétricamente por pares en cuatro lados distintos del dispositivo receptor de muestras (1, 31).
6. Sistema de medición de fluorescencia de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado porque** las fuentes de iluminación lineales (3, 21, 32, 41) están configuradas como barras halógenas lineales, como tubos fluorescentes o como tiras LED.
7. Sistema de medición de fluorescencia de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado porque** las fuentes de iluminación lineales (3, 21, 32, 41) están configuradas como conductores de fibra óptica dispuestos linealmente.
8. Sistema de medición de fluorescencia de acuerdo con la reivindicación 7, **caracterizado porque** las fibras ópticas (22) de los conductores de luz dispuestos linealmente están mezcladas de manera aleatoria.
9. Sistema de medición de fluorescencia de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizado porque** las fuentes de iluminación lineales (3, 21, 32, 41) emiten luz en una longitud de onda que corresponde a la longitud de onda de excitación para una excitación de fluorescencia de las muestras en el dispositivo receptor de muestras (1, 31).
10. Sistema de medición de fluorescencia de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 9, **caracterizado porque** las fuentes de iluminación lineales (3, 21, 32, 41) emiten luz de color o luz blanca filtrada de manera correspondiente.
11. Sistema de medición de fluorescencia de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 10, **caracterizado porque** las fuentes de iluminación lineales (3, 21, 32, 41) emiten la luz de lámparas de destello para la excitación pulsada o de lámparas UV para la excitación de fluorescencia en el intervalo UV.
12. Sistema de medición de fluorescencia de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 11, **caracterizado porque** las fuentes de iluminación lineales (3, 21, 32, 41) emiten la luz de un láser continuo o pulsado que se adaptó a la apertura numérica en el lado de entrada del haz de fibra óptica mediante una óptica de acoplamiento correspondiente.
13. Sistema de medición de fluorescencia de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 12, **caracterizado porque** el sistema detector (350) comprende un detector generador de imagen.
14. Sistema de medición de fluorescencia de acuerdo con la reivindicación 13, **caracterizado porque** el detector generador de imagen es un sistema de medición por vídeo, preferentemente con un intensificador de luz residual.
15. Sistema de medición de fluorescencia de acuerdo con la reivindicación 14, **caracterizado porque** el intensificador de luz residual es un dispositivo de gating.
16. Sistema de medición de fluorescencia de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 15, **caracterizado porque**

presenta uno o varios filtros (36) entre el dispositivo receptor de muestras (1, 31) y el sistema detector (35), que pueden seleccionar la luz fluorescente antes de la detección.

17. Sistema de medición de fluorescencia de acuerdo con la reivindicación 16, **caracterizado porque** varios filtros (36) están dispuestos en un cambiador de filtros (37).

5 18. Sistema de medición de fluorescencia de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 17, **caracterizado porque** presenta uno o varios espejos dicróicos (35) entre la placa de microtitulación (1, 31) y el sistema detector (350), mediante los que la luz fluorescente procedente del dispositivo receptor de muestras (1, 31) se puede dividir en dos o varias longitudes de onda y desacoplar de manera selectiva.

10 19. Sistema de medición de fluorescencia de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 18, **caracterizado porque** la placa de microtitulación (1, 31) tiene una posición esencialmente horizontal y el sistema detector (350) está dispuesto por encima o por debajo de la placa de microtitulación (1, 31).

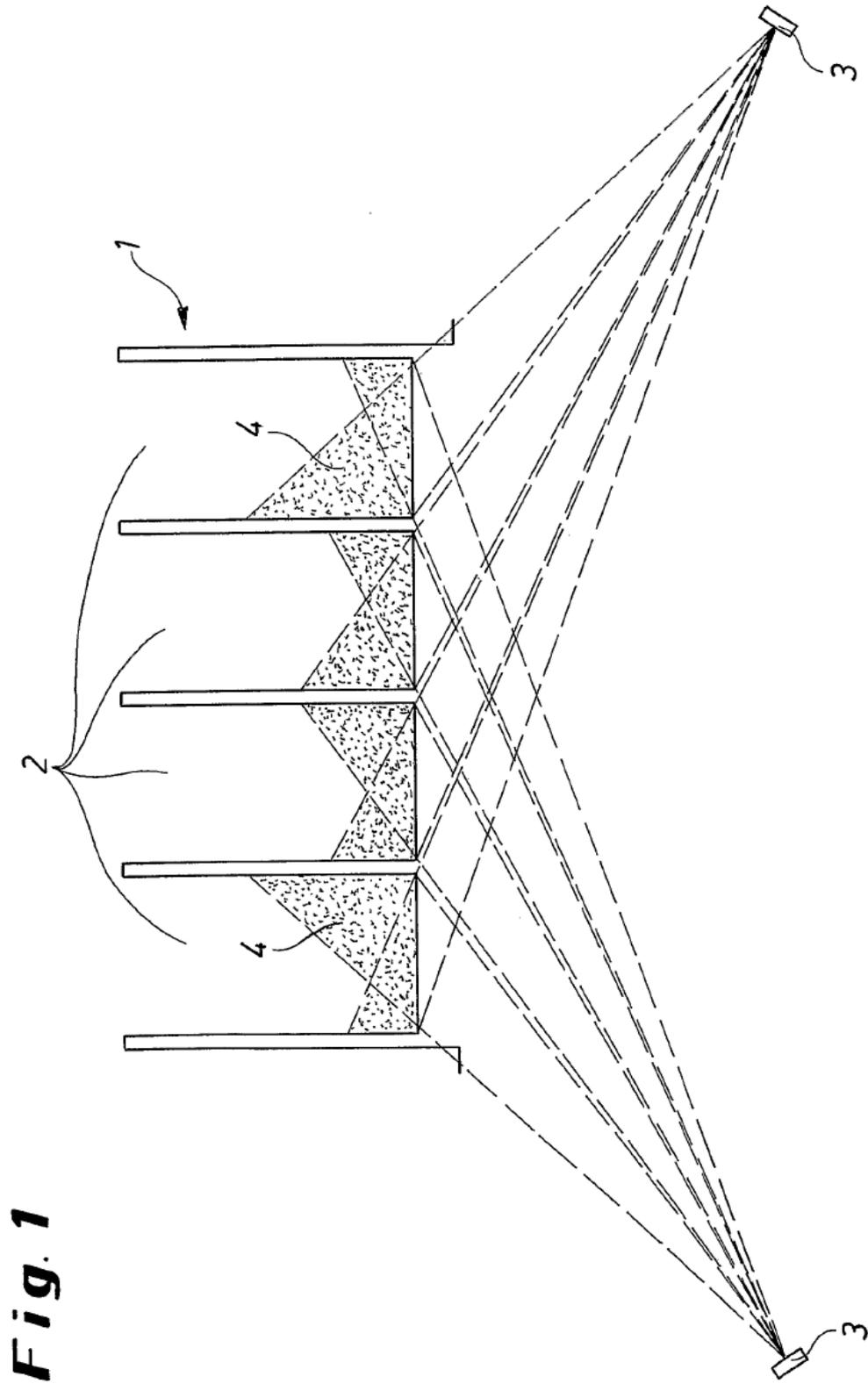


Fig. 1

Fig. 2

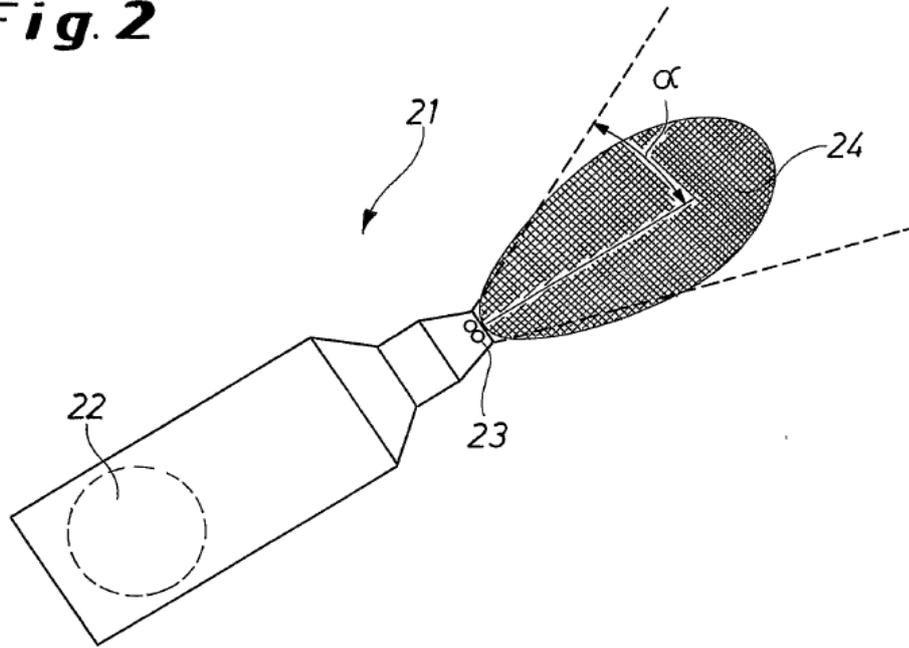
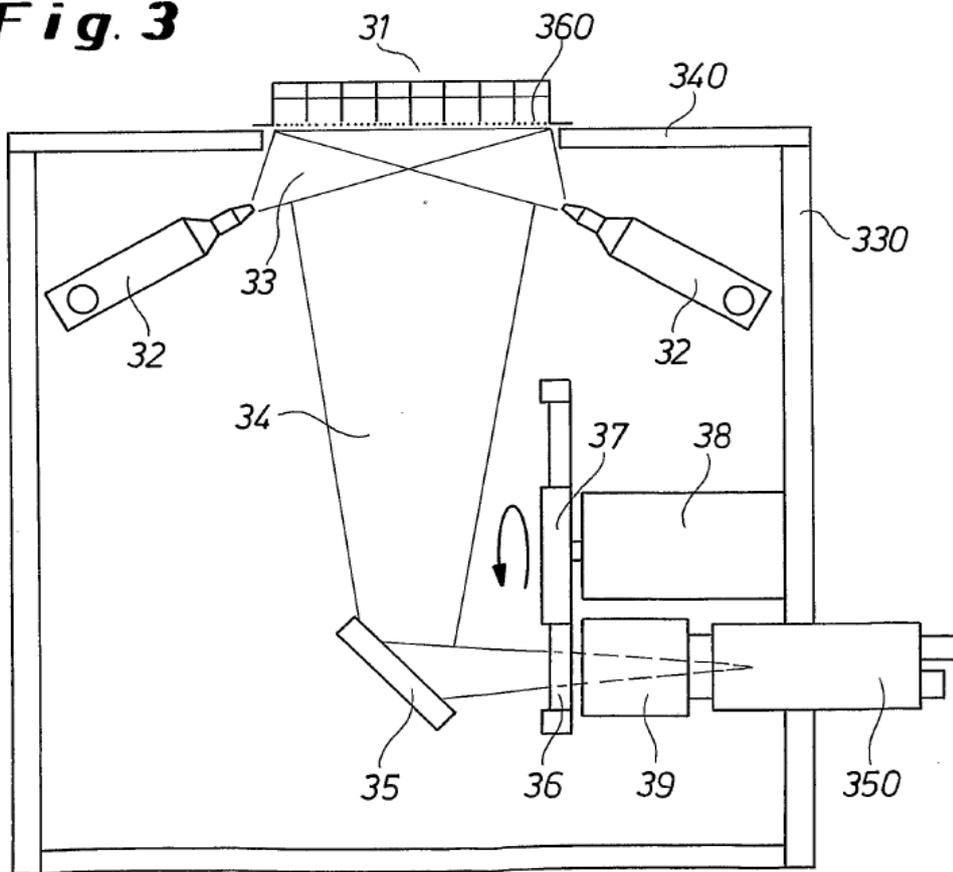


Fig. 3



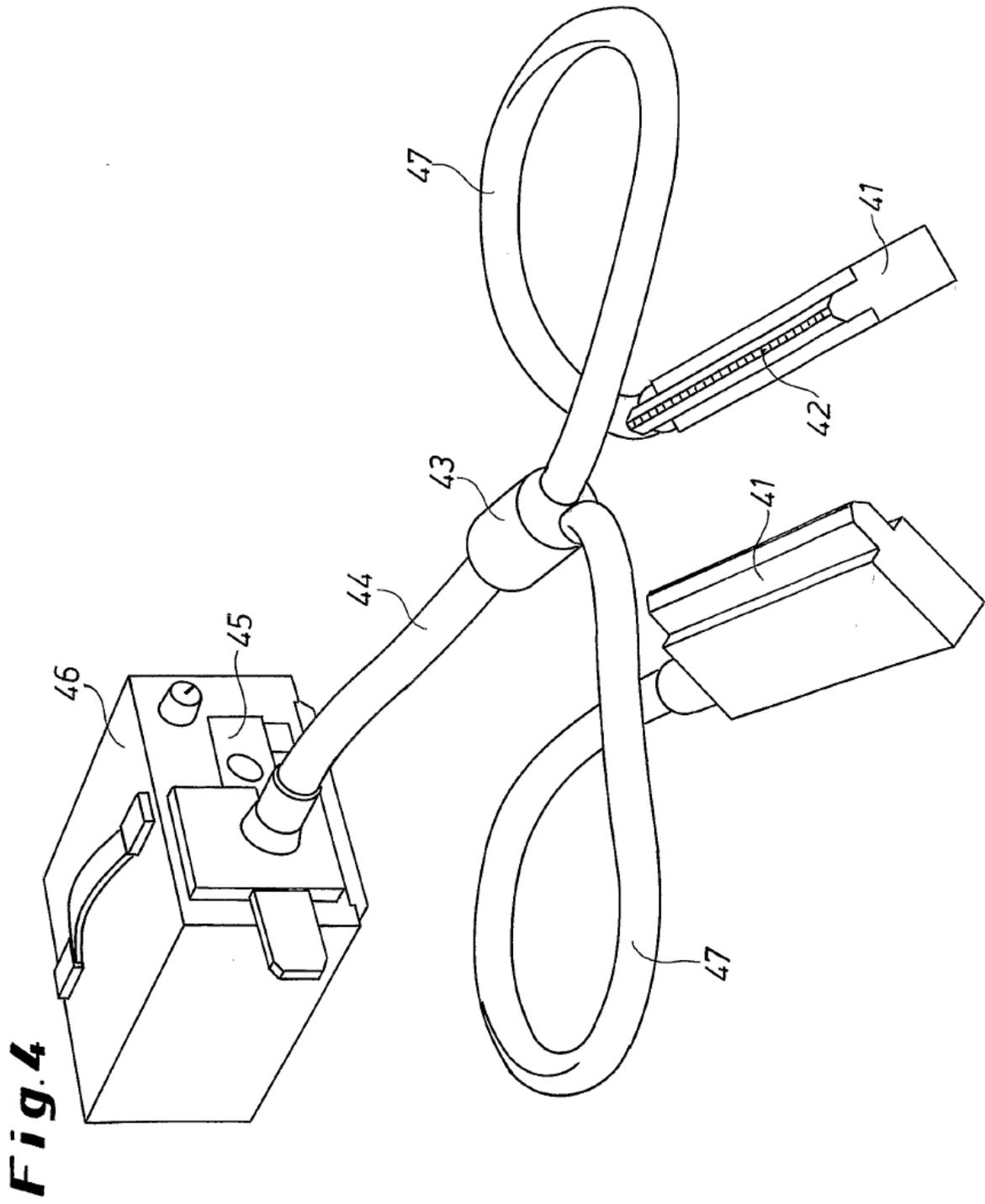


Fig. 5

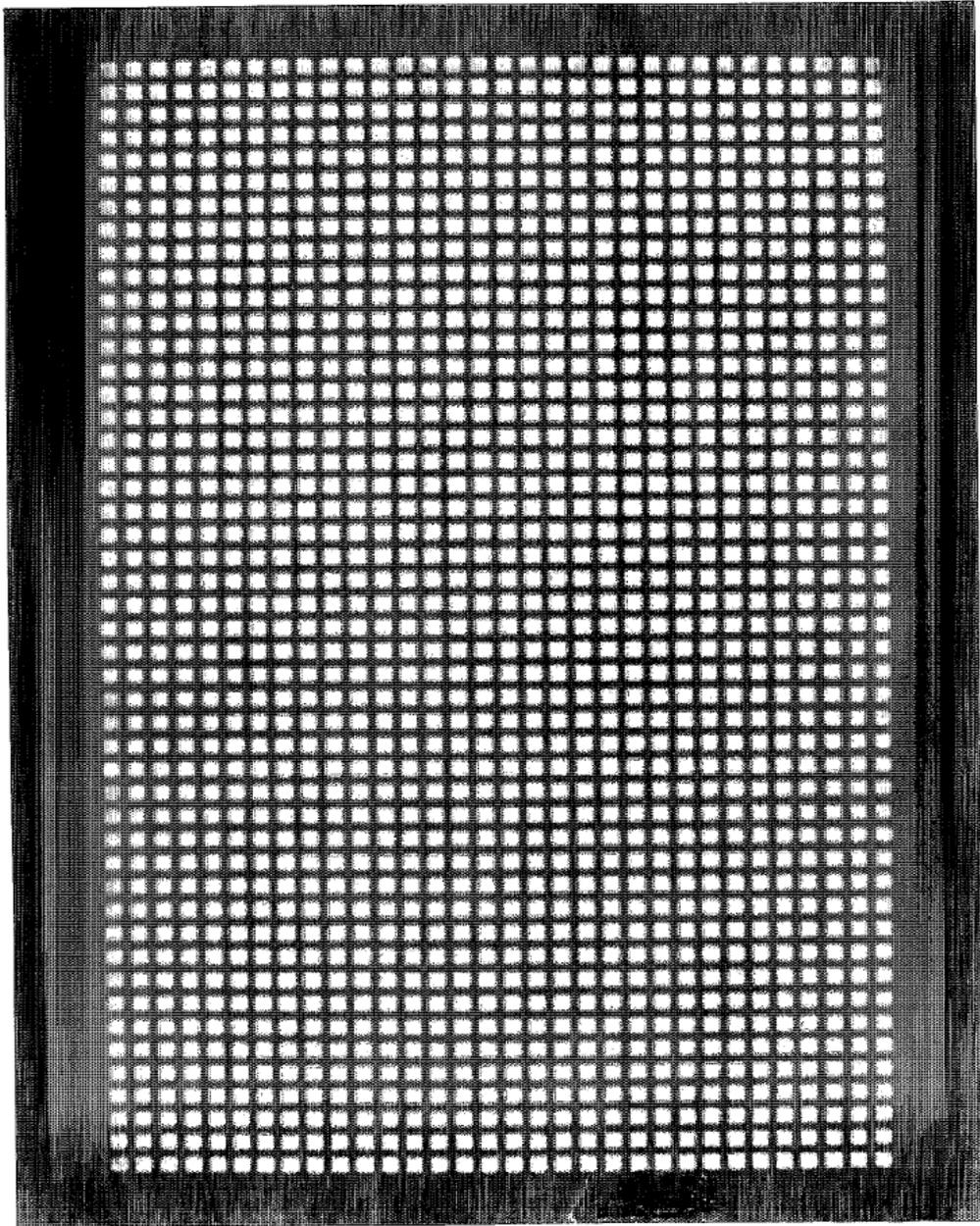


Fig. 6

