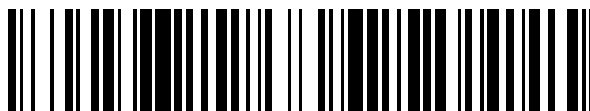


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 770 734**

51 Int. Cl.:

B01L 7/00 (2006.01)

C12Q 1/686 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.03.2015 PCT/EP2015/056454**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.10.2015 WO15144783**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.03.2015 E 15711799 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.12.2019 EP 3122461**

54 Título: **Dispositivo para el ciclado térmico simultáneo y uniforme de muestras y usos del mismo**

30 Prioridad:

28.03.2014 EP 14162212

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

02.07.2020

73 Titular/es:

**CURIOSITY DIAGNOSTICS SP. Z O.O. (100.0%)
ul. Duchnicka 3 bud. 16, wejście A, parter
01-796 Warsaw, PL**

72 Inventor/es:

**MELLEM, KRZYSZTOF;
GORZKOWSKI, DANIEL KRZYSZTOF;
BAJER-BORSTYN, SEWERYN;
ZAWADZKI, PAWEŁ;
GARSTECKI, PIOTR y
GEWARTOWSKI, KAMIL ROBERT**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 770 734 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

Dispositivo para el ciclado térmico simultáneo y uniforme de muestras y usos del mismo

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere al campo de los dispositivos de ciclado térmico, a sus usos y a métodos basados en los mismos. La presente invención en particular se refiere a un dispositivo de ciclado térmico que comprende: una ubicación de la muestra; un primer medio de calentamiento, en el que dicho primer medio de calentamiento está configurado para llevar una muestra en dicha ubicación de la muestra a al menos aproximadamente una primera temperatura; preferentemente dicho primer medio de calentamiento es un medio de calentamiento por contacto; un segundo medio de calentamiento, en el que dicho segundo miembro de calentamiento está configurado para llevar dicha muestra a una segunda temperatura dirigiendo radiación electromagnética al primer extremo de la sección del tubo de luz y la sección del tubo de luz está configurada para dirigir dicha radiación electromagnética a través de su segundo extremo a la ubicación de la muestra. De acuerdo con la presente invención, se usa un tubo de luz (o una sección de tubo de luz) para homogeneizar la distribución de intensidad espacial de la radiación electromagnética de calentamiento y para iluminar dicha muestra en dicha ubicación de muestra con luz durante el ciclado térmico. La presente invención también se refiere a los usos del termociclador y del tubo de luz de la presente invención y a los métodos de amplificación por PCR ultrarrápidos basados en los mismos. La invención también se refiere a un dispositivo de ciclado térmico que comprende: a) una ubicación de la muestra (4); b) una primera sección de tubo de luz al menos operable para recoger radiación electromagnética; c) una segunda sección de tubo de luz al menos operable para recoger excitación fluorescente y transmitir luz de emisión de fluorescencia; d) una tercera sección de tubo de luz al menos operable para iluminar la ubicación de la muestra (4) con radiación electromagnética y excitación fluorescente y para transmitir luz de emisión fluorescente a la segunda sección de tubo de luz; e) un filtro óptico configurado para reflejar la luz visible y transmitir radiación electromagnética; en el que cada sección de tubo de luz está configurada para homogeneizar la distribución de intensidad espacial de la luz y de la radiación electromagnética por medio de reflexión; a sus usos y a métodos basados en el mismo.

30 **Antecedentes de la invención**

La presente invención se refiere a dispositivos complejos de ciclado térmico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 que comprenden medios de calentamiento basados en radiación electromagnética combinados con medios de calentamiento por contacto y una sección de tubo de luz (o un tubo de luz) para el ciclado de temperatura uniforme y simultáneo de muestras (o de muestras múltiples, por ejemplo, muestras de PCR múltiples) que permiten ciclados térmicos uniformes (por ejemplo, al menos del 90 %, preferentemente al menos del 95 %, más preferentemente al menos del 98 %), simultáneos y ultrarrápidos (por ejemplo, de hasta 3,7 segundos, por ejemplo, de hasta 7 segundos, por ejemplo, en el intervalo de 3 a 7 segundos) sobre muestras (o sobre muestras múltiples, por ejemplo, muestra múltiples de PCR) en la ubicación de la muestra. La PCR (o reacción en cadena de la polimerasa) es un método para la amplificación de ácidos nucleicos o fragmentos de los mismos. La PCR es una técnica de diagnóstico que se usa habitualmente para detectar el ADN diana, por ejemplo, en el diagnóstico de una enfermedad infecciosa, oncológica o forense. En muchos casos es beneficioso obtener el resultado del ensayo lo más rápido posible, por ejemplo, para recetar medicamentos adecuados durante la visita al consultorio médico. Para amplificar el ADN diana, una reacción de PCR requiere cambios cíclicos de la temperatura de la muestra.

45 La amplificación por PCR generalmente comprende tres fases: desnaturalización, renaturalización de cebadores y extensión, que juntos forman un ciclo de PCR. Los ciclos de PCR se pueden repetir hasta que se amplifique la cantidad deseada del producto. El ciclo típico de PCR dura aproximadamente un minuto. Los termocicladores de PCR más avanzados pueden realizar un ciclo de PCR en aproximadamente 20 segundos.

50 Por esta razón, para reducir el tiempo de ensayo, es crucial proporcionar un método para calentar rápidamente la muestra (por ejemplo, muestras múltiples). La técnica anterior logra esta meta mediante radiación infrarroja, un método de calentamiento sin contacto que permite el calentamiento directo y rápido de la muestra, especialmente si el volumen de la muestra es bajo. Para proporcionar un diagnóstico preciso, es crucial ensayar la mayor cantidad posible de organismos patógenos potenciales, para eliminar resultados falsos negativos, lo que requiere que un gran número de reacciones de PCR se ciclen térmicamente de manera uniforme y simultánea. Por consiguiente, la presente invención proporciona medios para homogeneizar la distribución de intensidad espacial de la radiación electromagnética que mejora sustancialmente la uniformidad del perfil del ciclo térmico dentro de las muestras ensayadas. El ciclado térmico ultrarrápido de muestras múltiples de ácido nucleico por calentamiento infrarrojo requiere una cantidad sustancial de potencia. Asimismo, la PCR en tiempo real también exige una alta potencia de luz de excitación de fluorescencia para lograr una alta sensibilidad de detección. Las pérdidas de luz electromagnética darían como resultado un calentamiento más lento de las muestras o defectos en la detección y pueden dar lugar a un calentamiento no deseado del termociclador. La presente invención aborda este problema de dos maneras: en primer lugar, proporcionando una manera eficiente de recoger y transmitir radiación electromagnética y excitación de fluorescencia a la muestra (por ejemplo, muestras múltiples) y, en segundo lugar, proporcionando medios para el enfriamiento eficaz de las partes del termociclador que se calientan por las pérdidas restantes de energía radiada.

El uso de la presente invención proporciona ciclos de PCR uniformes, simultáneos y ultrarrápidos (por ejemplo, de hasta 3,7 segundos, por ejemplo, de hasta 7 segundos, por ejemplo, en el intervalo de 3 a 7 segundos) sobre muestras múltiples (por ejemplo, muestras múltiples de PCR). En la presente invención se contempla que al aumentar la potencia de la radiación es posible alcanzar el límite de velocidad de polimerización de la polimerasa usada en una reacción de PCR (por ejemplo, ADN polimerasa), que se traduce en aproximadamente un ciclo de PCR de 1 segundo. Aunque el uso de radiación electromagnética para el calentamiento se conoce en la técnica anterior (Kim H., Dixit S., Green C.J., Faris G.W., 2009, Optics Express, Vol. 17, N.º 1), ninguno de los dispositivos de la técnica anterior proporciona ciclos térmicos uniformes, simultáneos y ultrarrápidos sobre muestras múltiples (por ejemplo, muestras múltiples de PCR).

5 PCR (por ejemplo, ADN polimerasa), que se traduce en aproximadamente un ciclo de PCR de 1 segundo. Aunque el uso de radiación electromagnética para el calentamiento se conoce en la técnica anterior (Kim H., Dixit S., Green C.J., Faris G.W., 2009, Optics Express, Vol. 17, N.º 1), ninguno de los dispositivos de la técnica anterior proporciona ciclos térmicos uniformes, simultáneos y ultrarrápidos sobre muestras múltiples (por ejemplo, muestras múltiples de PCR).

10 La técnica anterior también enseña a acelerar el enfriamiento de la muestra encerrada en un chip microfluídico por medio del elemento Peltier. Sin embargo, el control sobre la temperatura del bloque térmico no es suficiente para cambiar con precisión la temperatura de la muestra durante el ciclado térmico.

15 Por consiguiente, en la técnica anterior existe la necesidad de medios y métodos que permitan el ciclado térmico uniforme, simultáneo y ultrarrápido sobre muestras (o muestras múltiples, por ejemplo, muestras múltiples de PCR).

Para los fines de la presente invención, todas las referencias citadas en el presente documento se incorporan por referencia en su totalidad.

20 Sumario de la invención

La presente invención proporciona un dispositivo de ciclado térmico que comprende: una ubicación de la muestra; una fuente de luz, en el que dicha fuente de luz es una fuente de excitación de fluorescencia; un tubo de luz que comprende una sección de tubo de luz, comprendiendo la sección de tubo de luz un primer extremo y un segundo extremo; un primer medio de calentamiento que es una fuente de calor por contacto, en el que dicho primer medio de calentamiento está configurado para llevar una muestra o muestras múltiples en dicha ubicación de la muestra a al menos aproximadamente una primera temperatura; un segundo medio de calentamiento que es una fuente de radiación electromagnética, en el que dicho segundo miembro de calentamiento está configurado para llevar una muestra o para llevar simultáneamente muestras múltiples en dicha ubicación de muestra a una segunda temperatura dirigiendo la radiación electromagnética al primer extremo de la sección del tubo de luz y la sección del tubo de luz está configurada para dirigir dicha radiación electromagnética a través de su segundo extremo a la ubicación de la muestra y para homogeneizar una distribución de intensidad espacial de la radiación electromagnética por medio de reflexión; al menos un espejo dicróico; y una cámara configurada para detectar la fluorescencia emitida que proviene directamente de la ubicación de la muestra transmitida por la sección del tubo de luz sin reflejarse en las paredes del tubo de luz.

35 De acuerdo con otra realización de los dispositivos de ciclado térmico de la invención anteriores, dicha cámara del dispositivo de ciclado térmico de la invención comprende un objetivo que solo permite que la luz provenga directamente de la ubicación de la muestra, es decir, sin que atraviere ninguna luz reflejada en las paredes del tubo de luz.

40 De acuerdo con otra realización de los dispositivos de ciclado térmico de la invención anteriores, dicho segundo medio de calentamiento es una fuente de radiación electromagnética infrarroja.

De acuerdo con otra realización de los dispositivos de ciclado térmico de la invención anteriores, dicho tubo de luz está hecho de metal.

45 De acuerdo con otra realización de los dispositivos de ciclado térmico de la invención anteriores, dicho tubo de luz está configurado para presionar dicha ubicación de muestra contra dicha fuente de calor por contacto.

50 De acuerdo con otra realización de los dispositivos de ciclado térmico de la invención anteriores, dicho tubo de luz está configurado para iluminar simultáneamente dichas muestras múltiples en dicha ubicación de muestra con luz durante el ciclado térmico por medio de reflexión.

De acuerdo con otra realización de los dispositivos de ciclado térmico de la invención anteriores, dicho tubo de luz tiene una sección transversal seleccionada del grupo que consiste en: sección transversal rectangular, cuadrada y hexagonal.

60 De acuerdo con otra realización, los dispositivos de ciclado térmico de la invención anteriores comprenden además al menos un filtro de fluorescencia, en los que dicho filtro de fluorescencia está configurado para medir los cambios de intensidad de fluorescencia de un colorante sensible a la temperatura agregado a la muestra, preferentemente dicho colorante sensible a la temperatura es Rodamina B, más preferentemente dicho filtro de fluorescencia (9) es un filtro multibanda.

65 De acuerdo con otra realización, los dispositivos de ciclado térmico de la invención anteriores se usan para el ciclado térmico uniforme y simultáneo de muestras, preferentemente para el ciclado térmico de muestras uniforme, simultáneo y ultrarrápido.

De acuerdo con otra realización, los dispositivos de ciclado térmico de la invención anteriores se usan para medir la temperatura de las muestras en tiempo real.

5 De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método para realizar el ciclado térmico usando el dispositivo de ciclado térmico de acuerdo con la presente invención. El método de la invención comprende las siguientes etapas: dirigir dicha radiación electromagnética a dicha ubicación de muestra usando el segundo medio de calentamiento y usando la homogeneización de la distribución de intensidad espacial de la radiación electromagnética;
 10 iluminar dicha ubicación de muestra con luz durante el ciclado térmico usando la fuente de luz;
 y realizar la detección de fluorescencia en tiempo real usando la cámara.

De acuerdo con otra realización, el método de la invención se usa para la amplificación uniforme y simultánea de muestras con PCR, en el que la ubicación de muestra comprende muestras múltiples y dichas muestras comprenden un ácido nucleico o un fragmento del mismo, combinada con la detección en tiempo real del producto amplificado. El método preferido comprende:

- a) mantener la temperatura del primer medio de calentamiento a una temperatura específica, en donde dicha temperatura específica es inferior o igual a la temperatura de renaturalización de los cebadores de PCR;
- 20 b) mientras se mantiene dicha temperatura constante, encender una fuente de radiación electromagnética a una potencia constante durante un período de tiempo especificado, en el que dichas muestras se calientan de manera uniforme y simultánea hasta que alcanzan la temperatura de desnaturalización del ADN;
- c) mientras se sigue manteniendo constata la temperatura del primer medio de calentamiento, apagar la fuente de radiación electromagnética durante un período de tiempo especificado, en el que dichas muestras se enfrían; preferentemente repetir las etapas (b)-(c) al menos 15 veces, más preferentemente repetir las etapas (b)-(c) al menos 20 veces, lo más preferentemente repetir las etapas (b)-(c) al menos 30 veces, aún más preferentemente repetir las etapas (b)-(c) al menos 40 veces;
- 25 d) después de un período de tiempo especificado, encender la fuente de excitación de fluorescencia, en donde dichas muestras se excitan de manera uniforme y simultánea, y simultáneamente se realiza la detección de luz de fluorescencia emitida usando la cámara.

30

Breve descripción de los dibujos

Las figuras 1-4 y 9-10 describen dispositivos a modo de ejemplo de la presente invención. Las figuras 5-8 y 11 describen análisis a modo de ejemplo de curvas de fusión de muestras amplificadas en el dispositivo de la presente invención mediante el método de la presente invención.

35

Descripción detallada de la invención

La uniformidad del calentamiento basado en radiación electromagnética es fundamental para el ciclado uniforme, simultáneo y ultrarrápido de muestras en la ubicación de muestra (por ejemplo, muestras múltiples), lo cual es especialmente importante para aplicaciones de alto rendimiento (por ejemplo, aplicaciones de PCR de alto rendimiento). Asimismo, La detección precisa de fluorescencia de múltiples productos de reacción en un dispositivo de ciclado térmico solo es posible con una iluminación homogeneizada (o uniforme) y un ciclado térmico uniforme sobre las muestras. Una fuente de radiación electromagnética sin medios de mejora de la uniformidad frente a una ubicación de muestra que comprende muestras múltiples en un dispositivo de ciclado térmico administraría energía electromagnética de manera desigual a diferentes muestras en la ubicación de muestra y, por lo tanto, calentaría dichas muestras de manera desigual. La presencia de dispositivos ópticos adicionales dentro de dicho dispositivo de ciclado térmico complicaría aún más las limitaciones espaciales para administrar radiación electromagnética homogeneizada en la ubicación de muestra. Por lo tanto, el problema a resolver por la presente invención es, entre otras cosas, proporcionar dispositivos de ciclado térmico mejorados basados en radiación electromagnética libres de los defectos conocidos de la técnica anterior, especialmente cuando se ciclan térmicamente muestras múltiples en un dispositivo de ciclado térmico basado en radiación electromagnética. El otro problema a resolver por la presente invención es proporcionar un dispositivo de ciclado térmico con características mejoradas de consumo de potencia y/o de control de temperatura y/o de desgaste y/o de seguridad y/o de costes.

55 En particular, la presente invención aborda este problema de dos maneras: en primer lugar, proporcionando una manera eficiente de recoger y transmitir radiación electromagnética y excitación de fluorescencia a una muestra (por ejemplo, muestras múltiples) en la ubicación de muestra y, en segundo lugar, proporcionando medios para el enfriamiento eficaz de las partes que se calientan por las pérdidas restantes de energía radiada.

60 El problema se resuelve, entre otras cosas, de acuerdo con las reivindicaciones 1-8 de la presente invención. Por lo tanto, la presente invención proporciona ventajosamente medios (por ejemplo, sección de tubo de luz, tubo de luz) que se usan para homogeneizar la distribución de intensidad espacial de la radiación electromagnética de calentamiento y, por lo tanto, proporcionan un aumento significativo de la uniformidad del calentamiento basado en radiación electromagnética. En una realización de la invención, la uniformidad de la radiación electromagnética lograda en la ubicación de la muestra es al menos del 90 %. En otra realización, la uniformidad de la radiación electromagnética

65

lograda en la ubicación de la muestra es al menos del 95 %. En otra realización de la invención, la uniformidad de la radiación electromagnética lograda en la ubicación de la muestra es al menos del 98 %. La presente invención proporciona además dispositivos, medios y métodos para el ciclado de temperatura uniforme, simultáneo y ultrarrápido de muestras (o muestras múltiples, por ejemplo, muestras de PCR múltiples) que permiten ciclados térmicos uniformes, simultáneos y ultrarrápidos sobre dichas muestras (por ejemplo, ciclos de PCR de hasta 3,7 segundos, por ejemplo, ciclos de PCR de hasta 7 segundos, por ejemplo, ciclos de PCR en el intervalo entre 3 y 7 segundos). En otra realización, la presente invención proporciona dispositivos, medios y métodos para la detección de fluorescencia en tiempo real de productos de reacción, que permiten monitorizar el progreso de la reacción de las muestras. Por consiguiente, un dispositivo de ciclado térmico de la presente invención comprende:

- una ubicación de muestra (4);
- una fuente de luz (5), en el que dicha fuente de luz (5) es una fuente de excitación de fluorescencia;
- un tubo de luz (1) que comprende una sección de tubo de luz, comprendiendo la sección de tubo de luz un primer extremo y un segundo extremo;
- un primer medio de calentamiento (3) que es una fuente de calor por contacto, en el que dicho primer medio de calentamiento está configurado para llevar una muestra o muestras múltiples en dicha ubicación de muestra (4) a al menos aproximadamente una primera temperatura;
- un segundo medio de calentamiento (2) que es una fuente de radiación electromagnética, en el que dicho segundo miembro de calentamiento (2) está configurado para llevar una muestra o para llevar simultáneamente muestras múltiples en dicha ubicación de muestra (4) a una segunda temperatura dirigiendo la radiación electromagnética al primer extremo de la sección del tubo de luz y la sección del tubo de luz está configurada para dirigir dicha radiación electromagnética a través de su segundo extremo a la ubicación de la muestra (4) y para homogeneizar una distribución de intensidad espacial de la radiación electromagnética por medio de reflexión;
- al menos un espejo dicróico (6, 7);
- y una cámara (8) configurada para detectar la fluorescencia emitida que proviene directamente de la ubicación de la muestra (4) transmitida por la sección del tubo de luz sin reflejarse en las paredes del tubo de luz. Por lo tanto, la presencia de dos medios de calentamiento proporciona un cambio rápido de temperatura en la ubicación de la muestra, por ejemplo, porque el primer medio de calentamiento (3) lleva una muestra en la ubicación de muestra a una temperatura de referencia (por ejemplo, al menos aproximadamente una primera temperatura), mientras que el segundo medio de calentamiento (2) está configurado para llevar dicha muestra a una segunda temperatura (por ejemplo, para calentar más dicha muestra desde dicha temperatura de referencia). En otra realización, "al menos aproximadamente una primera temperatura" es "primera temperatura", por ejemplo, aproximadamente la temperatura de renaturalización de los cebadores de PCR. En una realización de la invención, dicha primera temperatura no es igual a dicha segunda temperatura. En otra realización de la invención, dicha primera temperatura es menor que dicha segunda temperatura. En otra realización de la invención, dicha primera temperatura es inferior o igual a la temperatura de renaturalización de los cebadores de PCR. En otra realización de la invención, dicha segunda temperatura es una temperatura de desnaturalización de ADN (por ejemplo, desnaturalización de ADN de productos de amplificación por PCR). Un tubo de luz (1) (o sección de tubo de luz) de la presente invención es multifuncional porque permite distribuir energía electromagnética a las muestras de manera uniforme y simultánea desde una fuente de calor electromagnética e iluminar de manera uniforme y simultánea dichas muestras con luz durante dicho ciclado térmico. En otra realización de la invención, el tubo de luz proporciona medios para distribuir de manera uniforme, simultánea y ultrarrápida la luz para el termociclado, la iluminación y la detección de una multitud de cámaras de reacción independientes. En el curso de la presente invención, el término "configurado para" puede tener el significado de influir directa o indirectamente en el parámetro (o parámetros) especificado(s). En alguna realización de la invención, dicho término "configurado para" se selecciona para que tenga el significado de influir directamente en el parámetro (o parámetros) especificado(s). En otra realización más de la invención, la sección de tubo de luz tiene propiedades y/o dimensiones del tubo de luz (1) como se describe en el presente documento. En otra realización más, el tubo de luz (o la sección de tubo de luz) es una parte integral del dispositivo de ciclado térmico de la presente invención.

En una realización de la invención, el tubo de luz (1) (o la sección de tubo de luz) es un tubo de luz de metal (o una sección de tubo de luz de metal). En una realización preferida de la invención, el tubo de luz (1) (o una sección de tubo de luz) es un tubo de luz hueco (o una sección de tubo de luz hueca). En una realización preferida adicional de la invención, el tubo de luz (1) (o la sección de tubo de luz) es un tubo de luz hueco de metal (o una sección de tubo de luz hueca de metal). En la realización más preferida de la invención, el tubo de luz (1) (o la sección de tubo de luz) es hueco y reflectante. En otra realización de la invención, el tubo de luz (1) (o la sección de tubo de luz) tiene preferentemente una sección transversal rectangular y está hecho de espejos de superficie frontal. Como alternativa, está hecho de metal sólido recubierto con plata u oro para aumentar su reflectividad. El tubo de luz (1) (o la sección de tubo de luz) hueco de la presente invención puede estar hecho de cualquier material que pueda recubrirse con metal para que la superficie sea reflectante y pueda soportar la radiación de alta potencia. Como alternativa, el material del tubo de luz (1) (o de la sección de tubo de luz) hueco de la presente invención tiene un recubrimiento óptico, para que forme un espejo dieléctrico reflectante. En otra realización de la invención, el tubo de luz (1) (o la sección de tubo de luz) es un tubo de luz de vidrio sólido, sin embargo, dicho tubo de luz de vidrio sólido podría estar asociado con una pérdida de luz al entrar en la varilla. En otra realización de la invención, la fuente de radiación electromagnética (2) emite una longitud de onda cercana a la longitud de onda de la luz visible, de modo que la superficie del tubo de luz (1) (o de la sección de tubo de luz) tiene propiedades similares para proporcionar uniformidad de calentamiento con

energía electromagnética y uniformidad de iluminación. A medida que la energía electromagnética no uniforme y/o la luz emitida por una fuente respectiva entra al tubo de luz (1) (o a la sección de tubo de luz) se refleja muchas veces desde sus superficies y después de cada reflexión aumenta la uniformidad de la radiación y/o la luz. Sin embargo, en un objetivo común, las paredes reflectantes son un gran inconveniente porque reflejan los rayos parásitos y distorsionan la imagen, por lo tanto, los productores de objetivos generalmente hacen que las paredes de un objetivo sean negras (es decir, no reflectantes). En otra realización más de la invención, el tubo de luz (o la sección de tubo de luz) de la presente invención no es un objetivo (por ejemplo, no es una lente objetivo, por ejemplo, no es una lente objetivo 10X). En otra realización más de la invención, el tubo de luz (o la sección de tubo de luz) de la presente invención no es circular. En una realización de la invención, la uniformidad de al menos el 90 % (preferentemente de al menos el 95 %, más preferentemente mayor del 95 %) se logra con la elección particular de la longitud del tubo. En dicha realización de la invención, el tubo de luz tiene las siguientes dimensiones: 16x17x150 mm y la uniformidad de la radiación electromagnética y la distribución de la luz lograda en la ubicación de la muestra es del 90 %. Se usan dos barras de diodos con lentes divergentes como fuentes de radiación electromagnética y de luz. En otra realización de la invención, se usan pilas verticales de diodos como fuentes de radiación electromagnética y de luz. En una realización de la presente invención, los términos "luz" (o "luz visible") y "radiación electromagnética" se seleccionan para que no se superpongan: el término "luz" (o "luz visible") se selecciona del intervalo de longitudes de onda que puede usarse para excitar colorantes fluorescentes; por tanto, el término "luz" (o "luz de excitación") se selecciona de longitudes de onda que oscilan entre 100 nm y aproximadamente 800 nm (por ejemplo, menos de 800, por ejemplo, 799 nm); el intervalo de excitación se superpone con el intervalo de emisión (detección); el término "radiación electromagnética" se selecciona del intervalo de longitudes de onda que se pueden usar para calentar la muestra en la ubicación de la muestra, preferentemente para calentar agua mediante la absorción de la radiación, por ejemplo, el agua comienza a absorber a 500 nm, pero preferentemente el límite inferior prácticamente útil es aproximadamente a 800 nm (por ejemplo, igual a 800 nm o más de 800 nm). El límite superior para el intervalo de calentamiento es prácticamente ilimitado, por ejemplo, pueden usarse incluso 100 micrómetros. Por lo tanto, en una realización preferida, la "luz" se selecciona de longitudes de onda de excitación en el intervalo de 100 nm a aproximadamente 800 nm (por ejemplo, menos de 800, por ejemplo, 799 nm), mientras que la "radiación electromagnética" se selecciona de longitudes de onda de calentamiento en el intervalo de 800 nm (por ejemplo, igual a 800 nm o más de 800 nm) a al menos 100 micrómetros. En una realización de la invención, se usa una longitud de onda de 976 nm o 1470 nm para calentar la muestra en la ubicación de la muestra. Ventajosamente, la absorción de radiación por el agua es muy alta a 1470 nm. En una realización de la invención, la longitud de onda de 1470 nm se usa preferentemente para calentar muestras en la ubicación de la muestra (por ejemplo, pequeñas alícuotas de la mezcla de amplificación por PCR), y/o se usa preferentemente para alícuotas localizadas en un dispositivo microfluídico. Por otro lado, la absorción de luz a 976 nm por el agua es mucho más débil. Sin embargo, en otra realización de la invención, la longitud de onda de 976 nm se usa preferentemente para calentar volúmenes de muestra más grandes (por ejemplo, recipientes de la mezcla de amplificación por PCR), y/o en aplicaciones en las que no se conoce el volumen exacto de las alícuotas. La desventaja de usar una longitud de onda que se absorbe más débilmente es que se pierde la mayor parte de la potencia emitida por el emisor. La ventaja, sin embargo, es que la muestra se calienta (absorbe) más uniformemente a lo largo de su altura. En otra realización de la invención, la longitud del tubo de luz es aproximadamente igual al tamaño del lado del tubo, en la que dicha longitud del tubo se define como la longitud óptica a lo largo de la cual la luz puede reflejarse en las paredes del tubo. En otra realización de la invención, una anchura del tubo es la dimensión característica de la sección transversal del tubo, perpendicular al camino óptico. Para secciones transversales cuadradas, la anchura es la anchura del cuadrado, para secciones transversales rectangulares, hay dos anchuras de la sección transversal. En otra realización de la invención, el tubo de luz (1) tiene una longitud variable (por ejemplo, al menos 2 cm, preferentemente la longitud entre 2 y 20 cm). En una realización de la invención, el tubo de luz (1) tiene un tamaño variable y/o una anchura variable. En la realización preferida de la invención, el tubo de luz (1) tiene una relación de anchura a longitud de aproximadamente 1, preferentemente dicha relación de anchura a longitud es mayor que 3, más preferentemente dicha relación de anchura a longitud es mayor que 5. En otra realización preferida de la invención, se usa un tubo más largo si dicho tubo tiene buena reflectividad porque un tubo más largo proporciona una mejor uniformidad.

Los tubos circulares se comportan de manera diferente: enfocan la radiación y producen puntos calientes en el medio. Por lo tanto, en otra realización más de la presente invención, el tubo de luz de la presente invención, por ejemplo, en un dispositivo de ciclado térmico de la presente invención, no puede ser un solo tubo circular (por ejemplo, en el que el tubo de luz no es un tubo circular o en el que el tubo de luz no es un solo tubo circular). En otra realización de la invención, el tubo de luz (1) comprende una cámara que tiene una superficie reflectante en un lado y una superficie semirreflectante en el otro lado para imitar una sección de tubo mucho más larga. Esto permite acortar el tubo de luz (1), lo cual es especialmente ventajoso para unas ubicaciones de muestra grandes (por ejemplo, recipientes o soportes) que requerirían tubos largos. En otra realización de la invención, el tubo de luz (1) tiene superficies internas que son reflectantes y que el volumen encerrado por el tubo es transmisor (por ejemplo, lleno de gas o con un material transparente diferente). En otra realización de la invención, la sección transversal del tubo de luz (1) es variable (por ejemplo, cuadrada, hexagonal y rectangular). Los tamaños de la ubicación de la muestra (por ejemplo, del recipiente) pueden ser variables, por ejemplo, 20x20 mm, 45x45 mm y similares. También son posibles tamaños más grandes también abarcados por la presente invención. En otra realización de la invención, la ubicación de la muestra (4) (por ejemplo, el soporte de muestra o el recipiente de muestra) está configurada para recibir muestras múltiples (por ejemplo, 5, 7, 8, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 42, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 190, 195, 200, 205, 210, 215, 220, 225, 230, 235, 240, 245, 250, 255, 260, 265, 270, 275, 280, 285, 290, 295, 300, 305, 310, 315, 320, 325, 330, 335, 340, 345, 350, 355, 360,

365, 370, 375, 380, 384, 385, 390, 395, 400, etc.). El dispositivo de la presente invención no está limitado por el número de muestras acomodadas por la ubicación de la muestra (4). En realizaciones adicionales, el tamaño de la ubicación de la muestra (4) es 20x20 mm o 45x45 mm, o una dimensión similar. En otra realización de la invención, la ubicación de la muestra (4) (por ejemplo, el recipiente de muestra o el soporte de muestra) está configurada para recibir una microplaca de PCR (por ejemplo, una placa de PCR de 384 pocillos o de 96 pocillos) o una tira de 8 tubos o un chip microfluídico que contiene 56 compartimentos de 0,6 µl y 8 compartimentos de 3,5 µl conocido de la técnica anterior.

5 En otra realización de la invención, la ubicación de la muestra (4) (por ejemplo, el recipiente de muestra o el soporte de muestra) está configurada para recibir muestras múltiples (por ejemplo, muestras múltiples de PCR) y se coloca en un primer medio de calentamiento (3) (por ejemplo, un bloque de calentamiento) o dicha ubicación de la muestra (4) está en contacto con un primer medio de calentamiento (3) (por ejemplo, una cámara térmica) mediante el uso de, por ejemplo, calentamiento/enfriamiento con un medio gaseoso o líquido. En otra realización de la invención, un primer medio de calentamiento (3) además de los medios para calentar las muestras comprende además medios para enfriar las muestras (o muestra) y/o medios para estabilizar la temperatura. En otra realización de la invención, el dispositivo de la presente invención comprende medios para estabilizar la temperatura en la ubicación de la muestra (4) (por ejemplo, el recipiente de muestra o el soporte de muestra). En otra realización de la invención, la cámara (8) (por ejemplo, usada en la detección) comprende un objetivo que solo permite que pase la luz proveniente directamente del recipiente de muestra (4) (o soporte de muestra) (es decir, sin ninguna luz reflejada en las paredes del tubo). En otra realización de la invención, el posicionamiento de la cámara (8) y/o de la fuente de luz (5) (preferentemente, la fuente de excitación) y/o de la fuente de calor electromagnética, en donde dicha fuente de calor electromagnética es una fuente de radiación electromagnética (2) (preferentemente, una fuente de infrarrojos (o IR)) es variable (por ejemplo, figura 1 y figura 2). En otra realización más de la invención, el tubo de luz (o la sección de tubo de luz) de la presente invención comprende en su interior al menos un filtro óptico descrito en el presente documento (por ejemplo, figuras 1-4, 9-10). Esto aumenta ventajosamente la eficiencia y/o precisión del dispositivo de la presente invención. Tal y como se ha mencionado anteriormente, un tubo de luz (1) (o sección de tubo de luz) de la presente invención es multifuncional porque permite distribuir energía electromagnética a las muestras múltiples de manera uniforme y simultánea desde una fuente de calor electromagnética e iluminar de manera uniforme y simultánea dichas muestras múltiples con luz durante dicho ciclo térmico. Por lo tanto, en otra realización más, el tubo de luz (1) (o la sección de tubo de luz) de la presente invención comprende al menos dos ramas reflectantes (por ejemplo, para una fuente de IR, cámara, etc.) que están interconectadas ópticamente por un filtro óptico dentro del tubo de luz (o de la sección de tubo de luz). Por consiguiente, en otra realización más, el dispositivo de ciclo térmico de la presente invención comprende dicho tubo de luz (o la sección del tubo de luz), es decir, con al menos un filtro óptico dentro (por ejemplo, figuras 1-4, 9-10). En otra realización de la invención, la fuente de radiación se coloca directamente sobre la entrada del tubo (por ejemplo, figura 2). El dispositivo de la presente invención comprende al menos un espejo dicróico (6, 7), preferentemente un conjunto de espejos dicróicos (6, 7), más preferentemente el espejo dicróico (6) es un espejo dicróico de fluorescencia multibanda, y aún más preferentemente los espejos dicróicos (6 y 7) son espejos dicróicos de fluorescencia multibanda. En otra realización de la invención, un filtro adicional (9), por ejemplo, un filtro de emisión de fluorescencia o por ejemplo, un filtro de emisión de fluorescencia multibanda, se sitúa entre el tubo de luz (1) y la cámara (8) (por ejemplo, figura 1), preferentemente dicho filtro refleja los IR y deja pasar la luz visible. En otra realización de la presente invención, un filtro adicional, por ejemplo, un filtro de excitación de fluorescencia o un filtro de excitación de fluorescencia multibanda, se sitúa entre el tubo de luz (1) y la fuente de luz (5) (por ejemplo, la fuente de excitación de fluorescencia), preferentemente dicho filtro de excitación refleja los infrarrojos (IR) y deja pasar la luz visible.

10 En otra realización de la invención, el espejo dicróico (7) refleja los IR y deja pasar la luz visible (por ejemplo, figura 1). En otra realización de la invención, el espejo dicróico (7) deja pasar los IR y deja pasar la luz visible o refleja selectivamente la luz visible (por ejemplo, figura 2). En otra realización de la invención, el filtro adicional (10) refleja la luz visible y deja pasar los IR (por ejemplo, figura 1). En otra realización de la invención, el espejo dicróico (7) deja pasar los IR y refleja la luz visible o selectivamente deja pasar la luz visible (por ejemplo, figura 2). En otra realización de la presente invención, el espejo dicróico (7) es un espejo dicróico de fluorescencia multibanda (por ejemplo, figuras 1 y 2). En otra realización de la presente invención, los espejos dicróicos (6, 7) son espejos dicróicos de fluorescencia multibanda (por ejemplo, figuras 1 y 2). En otra realización de la invención, el espejo dicróico (6) refleja la luz visible y deja pasar los IR (por ejemplo, figura 2). En otra realización de la invención (por ejemplo, figura 1 o 3) un dispositivo de ciclo térmico comprende: a) una ubicación de muestra (4); b) un primer medio de calentamiento (3), en el que dicho primer medio de calentamiento es una fuente de calor por contacto configurada para llevar una muestra en dicha ubicación de la muestra a al menos aproximadamente una primera temperatura; c) un segundo medio de calentamiento (2) que es una fuente de radiación electromagnética, en el que dicho segundo miembro de calentamiento (2) está configurado para llevar una muestra o para llevar simultáneamente muestras múltiples en dicha ubicación de muestra (4) a una segunda temperatura dirigiendo la radiación electromagnética al primer extremo de la sección del tubo de luz y la sección del tubo de luz está configurada para dirigir dicha radiación electromagnética a través de su segundo extremo a la ubicación de la muestra (4) y para homogeneizar una distribución de intensidad espacial de la radiación electromagnética por medio de reflexión; d) una fuente de luz (5), en el que dicha fuente de luz es una fuente de excitación de fluorescencia, e) al menos un espejo dicróico (6, 7), preferentemente un conjunto de espejos dicróicos (6, 7), más preferentemente el espejo dicróico (6) es un espejo dicróico de fluorescencia multibanda, más preferentemente los espejos dicróicos (6 y 7) son espejos dicróicos de fluorescencia multibanda; aún más preferentemente el espejo dicróico (7) refleja los IR y deja pasar la luz visible; f) una cámara (8) configurada para detectar la fluorescencia emitida que proviene directamente de la ubicación de la muestra (4) transmitida por la sección del tubo de luz sin reflejarse en las paredes del tubo de luz, preferentemente dicha cámara es una cámara de detección

de luz de fluorescencia emitida; g) al menos un filtro de fluorescencia (9), preferentemente dicho filtro de fluorescencia es un filtro de emisión, más preferentemente dicho al menos un filtro de fluorescencia es múltiples filtros de fluorescencia, lo más preferentemente dicho al menos un filtro de fluorescencia es un filtro de fluorescencia multibanda, aún más preferentemente dicho al menos un filtro de emisión de fluorescencia es un filtro de emisión de fluorescencia multibanda; aún más preferentemente el filtro (9) se sitúa entre la cámara (8) y el tubo de luz (1) (por ejemplo, figura 1); h) opcionalmente un filtro adicional (10), preferentemente en el que dicho filtro adicional refleja longitudes de onda por debajo del infrarrojo; aún más preferentemente dicho filtro adicional (10) refleja la luz visible y deja pasar los IR; aún más preferentemente el filtro (10) se sitúa entre el segundo medio de calentamiento (2) y el tubo de luz (1) (por ejemplo, figura 1); i) opcionalmente un filtro de excitación adicional (11), preferentemente situado entre la fuente de luz (5) y el tubo de luz (1) (por ejemplo, figura 3); aún más preferentemente dicho filtro de excitación es un filtro de excitación de fluorescencia multibanda.

En otra realización de la invención (por ejemplo, mostrada en la figura 2 o 4), un dispositivo de ciclado térmico de la invención comprende: a) una ubicación de muestra (4); b) un primer medio de calentamiento (3) que es una fuente de calor por contacto, en el que dicho primer medio de calentamiento está configurado para llevar una muestra o muestras múltiples en dicha ubicación de la muestra a al menos aproximadamente una primera temperatura; c) un segundo medio de calentamiento (2) que es una fuente de radiación electromagnética, en el que dicho segundo miembro de calentamiento está configurado para llevar dicha muestra o para llevar simultáneamente muestras múltiples en la ubicación de muestra a una segunda temperatura dirigiendo radiación electromagnética al primer extremo de la sección del tubo de luz (o al primer extremo del tubo de luz (1)) y la sección del tubo de luz (o el tubo de luz (1)) está configurada para dirigir dicha radiación electromagnética a través de su segundo extremo a la ubicación de la muestra (4) y para homogeneizar una distribución de intensidad espacial de la radiación electromagnética por medio de reflexión; d) una fuente de luz (5), en el que dicha fuente de luz es una fuente de excitación de fluorescencia; e) al menos un espejo dicróico (6, 7), preferentemente, dicho al menos un espejo dicróico (6, 7); refleja la luz visible y deja pasar los IR; aún más preferentemente un conjunto de espejos dicróicos (6, 7), más preferentemente el espejo dicróico (6) es un espejo dicróico de fluorescencia multibanda, aún más preferentemente los espejos dicróicos (6 y 7) son espejos dicróicos de fluorescencia multibanda; aún más preferentemente el espejo (7) deja pasar los IR y deja pasar la luz visible o refleja selectivamente la luz visible; f) una cámara (8) configurada para detectar la fluorescencia emitida que proviene directamente de la ubicación de la muestra (4) transmitida por la sección del tubo de luz sin reflejarse en las paredes del tubo de luz, preferentemente dicha cámara es una cámara de detección de luz de fluorescencia emitida; g) al menos un filtro de fluorescencia (9), preferentemente dicho filtro de fluorescencia es un filtro de emisión, más preferentemente dicho filtro de fluorescencia es múltiples filtros de fluorescencia, lo más preferentemente dicho al menos un filtro de fluorescencia es un filtro de fluorescencia multibanda, aún más preferentemente dicho al menos un filtro de emisión de fluorescencia es un filtro de emisión de fluorescencia multibanda; aún más preferentemente dicho filtro (9) se sitúa entre la cámara (8) y el tubo de luz (1); aún más preferentemente el filtro (9) refleja los IR y deja pasar la luz visible; h) opcionalmente un filtro de excitación adicional (11), preferentemente colocado entre la fuente de luz (5) y el tubo de luz (1) (por ejemplo, figura 4); aún más preferentemente dicho filtro de excitación es un filtro de excitación de fluorescencia multibanda; aún más preferentemente dicho filtro de excitación refleja los IR y deja pasar la luz visible. En otra realización de la presente invención, la detección de fluorescencia por cámara no usa reflejos de la pared interna del tubo de luz (preferentemente la cámara no detecta dichos reflejos y está configurada de tal manera que detecta solo la fluorescencia que proviene directamente de la muestra, sin reflejarse en las paredes del tubo, por ejemplo usando teleobjetivo o diafragma). En otra realización de la invención, el dispositivo de la presente invención comprende además al menos un filtro de fluorescencia (9), preferentemente dicho filtro de fluorescencia es un filtro de emisión, más preferentemente múltiples filtros de fluorescencia, lo más preferentemente dicho al menos un filtro de fluorescencia es un filtro de fluorescencia multibanda. En otra realización de la invención, el dispositivo de la presente invención comprende además un filtro de excitación que se sitúa justo después de la fuente de luz (5) (por ejemplo, justo después de la fuente de excitación, por ejemplo, entre la fuente de excitación y el tubo de luz). En otra realización de la invención, el dispositivo de la presente invención comprende además un filtro para fuente de radiación, preferentemente situado, por ejemplo, justo entre una fuente de radiación electromagnética y el tubo de luz. En otra realización de la invención, los filtros de fluorescencia de excitación y/o de emisión y/o los espejos dicróicos son opcionalmente multibanda. En otra realización de la invención, un filtro de excitación y/o un filtro de fluorescencia de emisión y/o los espejos dicróicos de la presente invención dejan pasar los IR. En otra realización más de la invención, se usan filtros ópticos adicionales que están diseñados para retener la función del tubo de luz al reflejar la longitud de onda deseada en lugares en los que podría haber un orificio en la pared del tubo de luz, por ejemplo, en la figura 1, (10) podría ser un filtro, mientras que, por ejemplo, en la figura 2, el filtro de excitación (por ejemplo, entre la cámara y el tubo de luz) y/o el filtro de emisión (por ejemplo, entre la fuente de luz y el tubo de luz) pueden tener esta funcionalidad. En otra realización de la invención, el dispositivo de la presente invención comprende muchos tubos de luz, que contienen cada uno una fuente separada de radiación electromagnética, conectados al tubo de luz principal, más grande, que finalmente calienta la muestra (o las muestras). En otra realización de la invención, el dispositivo de la presente invención proporciona medios de detección del progreso de la reacción durante el ciclado térmico (preferentemente medios de detección en tiempo real, aún más preferentemente medios de detección de fluorescencia en tiempo real de amplificación por PCR). En otra realización de la invención, el dispositivo de la presente invención comprende una fuente láser como fuente de radiación electromagnética (2). En otra realización de la invención, se usa una lente divergente de un eje (por ejemplo, en forma de medio cilindro) directamente en la fuente de IR (por ejemplo, el diodo de IR). El diodo de IR emite de manera diferente en las dos direcciones en el plano del diodo. La luz se colima en una dirección, mientras que es muy divergente en la otra dirección. Por lo tanto, el haz que proviene de

la fuente de IR se bifurca en la dirección en la que estaba colimado originalmente para obtener un haz tan divergente como sea posible. Por lo tanto, los haces están configurados para tener un número similar de reflexiones en todas las direcciones antes de que lleguen a la muestra (o muestras). En otra realización de la invención, el dispositivo de la presente invención comprende una ventana de vidrio transparente en un extremo del tubo para proteger el dispositivo del polvo. En otra realización de la invención, se agrega un filtro adicional al dispositivo de la presente invención para reflejar la luz de excitación desde la apertura que permite la iluminación IR (o viceversa si la fuente de IR se coloca por encima de la fuente de excitación).

En otra realización, el dispositivo de la presente invención comprende una lámpara halógena de alta potencia (por ejemplo, cientos de vatios) (por ejemplo, lámparas halógenas múltiples) en lugar de una fuente láser como segundo medio de calentamiento (2) (por ejemplo, como fuente de radiación electromagnética (2)). Esto permite ventajosamente lograr ciclos térmicos rápidos en un área grande y reduce los costes ya que una fuente láser es más de 100 veces más cara que una lámpara halógena por vatio de potencia. El área se considera grande desde un punto de vista microfluídico si cubre múltiples compartimentos microfluídicos (por ejemplo, el área grande puede ser 23x26 mm², preferentemente, la longitud lateral puede ser de entre 1 y 200 mm). La cantidad de potencia requerida de tal lámpara halógena de alta potencia depende de la velocidad de calentamiento requerida, del área superficial de salida del tubo y de la profundidad del compartimento microfluídico que influye en la eficiencia de absorción y que puede ser calculada fácilmente por una persona experta en la materia usando una metodología convencional. La velocidad de calentamiento de tal lámpara halógena de alta potencia puede estar entre 1 y 1000 K/s y preferentemente entre 3 y 100 K/s. En una realización preferida, se usan dos lámparas halógenas Osram HPL 93729 LL 750 W 230 V, cada una con 750 W para alcanzar una velocidad de calentamiento de 20 K/s en compartimentos microfluídicos que tienen una profundidad de 400 µm.

En otra realización preferida, el dispositivo de la presente invención comprende una lámpara (o lámparas) halógena(s) de la presente invención que es una fuente omnidireccional de energía que está encerrada dentro del tubo de luz de la presente invención (preferentemente con un extremo del tubo de luz cerrado, por ejemplo, el extremo donde se encuentra la lámpara halógena) para aumentar significativamente la eficiencia del dispositivo de la presente invención (por ejemplo, figuras 9 y 10).

En otra realización, el dispositivo de la presente invención comprende medios para bloquear completamente la radiación electromagnética, por ejemplo, un obturador mecánico que bloquea completamente la radiación electromagnética cuando está cerrado. El obturador mecánico de la presente invención, por ejemplo, puede ser una placa de metal que se desliza (por ejemplo, horizontalmente) en una abertura (por ejemplo, ranura) en la pared del tubo de luz (o la sección de tubo de luz) de la presente invención, por ejemplo, por medio de un motor eléctrico controlado por ordenador. Preferentemente, la placa se puede pulir para reducir el calentamiento térmico. El uso de un obturador mecánico en el dispositivo de la presente invención es especialmente beneficioso para lograr ciclos térmicos precisos (por ejemplo, un control preciso sobre parámetros que influyen en el ciclo de PCR tal como el halógeno en el tiempo) con una lámpara (o lámparas) halógena(s) como fuente de radiación electromagnética (2) ya que una lámpara halógena puede tener una gran inercia térmica y largos tiempos de conmutación (por ejemplo, los halógenos de alta potencia necesitan cientos de milisegundos para estabilizar la temperatura de sus filamentos y, en consecuencia, la potencia radiada cuando se enciende o apaga). Sin embargo, el uso de un obturador mecánico en el dispositivo de la presente invención también es beneficioso cuando se usan diodos láser como fuente de radiación electromagnética (2) porque la conmutación frecuente de diodos láser provoca tensión térmica en la estructura del diodo y, por lo tanto, acelera su envejecimiento.

En otra realización, el dispositivo de la presente invención comprende medios de enfriamiento del tubo de luz o de una sección de tubo de luz (por ejemplo, primero, segundo o tercero) de la presente invención (preferentemente medios de enfriamiento externos). Por lo tanto, debido al aumento de potencia, las pérdidas de radiación electromagnética pueden causar un calentamiento sustancial del tubo de luz (o de una sección de tubo de luz) con el tiempo, por ejemplo, si el tubo de luz (o una sección de tubo de luz) no está provisto de medios de enfriamiento externos, puede calentarse a más de 200 grados Celsius si el halógeno está constantemente encendido. Sin embargo, este problema puede resolverse ventajosamente mediante los medios de enfriamiento (por ejemplo, enfriamiento por aire o líquido) del tubo de luz (o de la sección de tubo de luz) en caso de la alta conductividad térmica del material del tubo de luz, lo que, entre otras cosas, aumenta el perfil de seguridad del dispositivo de la presente invención.

Los halógenos tienen un amplio espectro de radiación que se extiende aproximadamente de 300 nm a 4000 nm y por esta razón puede ser difícil obtener filtros ópticos (por ejemplo, filtros que se colocan dentro del tubo de luz (o de la sección de tubo de luz) como se describe en el presente documento) que tendrían características requeridas. Por lo tanto, en otra realización, el dispositivo de la presente invención comprende un filtro óptico de paso largo (12) (por ejemplo, figura 9). Tal filtro óptico de paso largo (12) puede, por ejemplo, dividir las partes de detección y de calentamiento del dispositivo de la presente invención (por ejemplo, figuras 9, 10). El filtro óptico de paso largo (12) de la presente invención, por ejemplo, refleja la luz visible y deja pasar la luz infrarroja. Preferentemente, un filtro óptico de paso largo (12) de la presente invención es un espejo dicróico, por ejemplo, el filtro dicróico de paso largo de 650 nm, 25,2 x 35,6 mm, N.º 69-902 de Edmund Optics.

En otra realización, el dispositivo de la presente invención comprende además un filtro óptico de paso largo (12), un

filtro opcional (13) que puede, por ejemplo, compensar una abertura (por ejemplo, un orificio) en la pared del tubo de luz (o de la sección de tubo de luz) de la presente invención reflejando la radiación IR y dejando pasar la luz visible, y un filtro opcional (14), que por ejemplo, puede ser exactamente del mismo tipo que el filtro (13) y que, por ejemplo, puede usarse para aumentar la simetría del tubo de luz causada por un comportamiento no ideal del filtro (13) y sirve para aumentar la uniformidad de la radiación (por ejemplo, figura 10). Esta realización es particularmente ventajosa por que permite el uso de un cubo de filtros de fluorescencia listo para usar, que preferentemente tiene filtros multibanda. En una realización, el filtro óptico de paso largo (12) puede, por ejemplo, reflejar la radiación electromagnética y dejar pasar la luz visible para mejorar la eficiencia del dispositivo.

En una realización particular, un dispositivo de la presente invención comprende además: un filtro óptico de paso largo (12) (por ejemplo, figura 9). En otra realización particular, un dispositivo de la presente invención comprende además: un filtro óptico de paso largo (12), un filtro opcional (13) y un filtro opcional (14) (por ejemplo, figura 10). Tal y como se ha mencionado anteriormente, la técnica anterior enseña a acelerar el enfriamiento de la muestra encerrada en un chip microfluídico por medio del elemento Peltier. Sin embargo, el control sobre la temperatura del bloque térmico no es suficiente para cambiar con precisión la temperatura de la muestra durante el ciclado térmico. Un parámetro igualmente importante es la conductancia de contacto térmico que influye significativamente en la velocidad de transferencia de calor, especialmente durante el ciclado térmico rápido. El coeficiente de conductancia de contacto térmico tiene un significado ordinario conocido en la técnica y describe la capacidad para conducir calor entre dos cuerpos en contacto. El factor de mayor influencia en el valor del parámetro de conductancia de contacto térmico es la presión de contacto. Por ejemplo, la presión de contacto resulta de la fuerza que actúa sobre la superficie del chip microfluídico cuando se presiona contra el bloque de calentamiento. La presión preferida puede ser aproximadamente de 0,1-100 MPa. La presente invención, en particular, proporciona una manera de controlar el valor de la conductancia de contacto térmico por medio de la presión ejercida a través de la estructura rígida del conjunto de tubo de luz (o conjunto de sección de tubo de luz) de una manera que permite la distancia más corta posible entre el chip y el tubo de luz (o una sección de tubo de luz) y facilita la carga del chip al dispositivo de la presente invención. Por lo tanto, durante el transcurso de la presente invención, se observó sorprendentemente que el aumento de la presión ejercida sobre la ubicación de la muestra (4) (por ejemplo, el chip microfluídico) en el dispositivo de la presente invención provoca un enfriamiento más rápido de la ubicación de la muestra (4) (por ejemplo, de muestras múltiples). Asimismo, si la ubicación de la muestra (4) (por ejemplo, un chip, un chip microfluídico) se coloca en el primer medio de calentamiento (3) que es una fuente de calor por contacto (por ejemplo, un bloque de calentamiento) sin presión aplicada, pueden producirse diferencias en la velocidad de calentamiento entre diferentes chips, que, por ejemplo, resultan de la repetibilidad no ideal del proceso de producción de chips. Este problema puede resolverse ventajosamente usando material intersticial que llene huecos microscópicos entre una ubicación de muestra (por ejemplo, un chip) y el primer medio de calentamiento (3) que es una fuente de calor por contacto (por ejemplo, un bloque de calentamiento) tal como aceite mineral o por medio de presión externa aplicada sobre la ubicación de muestra (o ambas), que son realizaciones de la presente invención. Por lo tanto, en una realización, el dispositivo de la presente invención comprende además un tubo de luz (o una sección de tubo de luz) de estructura rígida y medios para mover el tubo de luz (o la sección de tubo de luz) (por ejemplo, verticalmente) y para ejercer fuerza (por ejemplo, fuerza constante) sobre la ubicación de la muestra (4). Cualquier medio que pueda mover el tubo de luz (o una sección de tubo de luz) y ejercer fuerza en el intervalo de 1 a 10000 N sobre la ubicación de la muestra (4) es adecuado (por ejemplo, un accionamiento mecánico). La fuerza requerida depende de la presión de contacto deseada. Los medios de ejemplo para mover el tubo de luz (o una sección de tubo de luz) (por ejemplo, accionamientos mecánicos) que se pueden usar en el dispositivo de la presente invención son un accionador de tornillo lineal o un motor lineal. El tubo de luz (o una sección de tubo de luz) de estructura rígida puede, por ejemplo, estar hecho de un metal grueso (aproximadamente 3 mm) y puede presionar directamente (por ejemplo, presionar constantemente) la ubicación de muestra (4) (por ejemplo, un chip microfluídico) sin doblarse o romperse con una fuerza en el intervalo de 1 a 10000 N. Un experto en la materia puede evaluar fácilmente si el conjunto de tubo de luz (o sección del tubo de luz) se puede operar de manera segura con tal fuerza. En una realización preferida, el dispositivo de la presente invención comprende un accionamiento mecánico y un tubo de luz (o una sección de tubo de luz) de estructura rígida para presionar directamente un chip microfluídico contra el primer medio de calentamiento (3) (por ejemplo, un bloque térmico) con una fuerza controlada (por ejemplo, fuerza constante) en el intervalo de 1 a 10000 N. Este enfoque tiene múltiples ventajas, por ejemplo, en primer lugar, compensa las imprecisiones de la superficie del chip, en segundo lugar, permite una rápida transferencia de calor durante el enfriamiento y/o calentamiento y, en tercer lugar, permite una fácil colocación del chip debajo del tubo de luz (o de la sección de tubo de luz) de la presente invención. En otra realización, un dispositivo de la presente invención comprende una placa situada entre el tubo de luz (o la sección de tubo de luz) de la presente invención y la ubicación de muestra (4). Por lo tanto, para presionar de manera más regular, se puede usar una placa de este tipo (por ejemplo, una placa de vidrio, una placa de vidrio gruesa) en el extremo del tubo de luz (por ejemplo, en el extremo que está en contacto con (o más cercano a) la ubicación de muestra (4)) en el dispositivo de la presente invención que también protege el dispositivo de la presente invención del polvo. En ausencia de tal placa, el tubo de luz (o la sección de tubo de luz) de la presente invención presiona la ubicación de la muestra (4) (por ejemplo, un chip microfluídico) solo con sus lados, lo que en el caso de una ubicación de muestra (4) no perfectamente plana (por ejemplo, un chip microfluídico), puede causar falta de contacto físico con un primer medio de calentamiento (3) (por ejemplo, un bloque de calentamiento) en el centro de la ubicación de muestra (4) (por ejemplo, del chip microfluídico) y, en consecuencia, diferencias en la transferencia de calor sobre la ubicación de la muestra (4). El espesor requerido de la placa depende en gran medida de la presión. El espesor a modo de ejemplo está entre 0,5 y 10 mm y preferentemente entre 1 y 5 mm.

5 El material de la placa que presiona la ubicación de muestra (4) (por ejemplo, un chip microfluídico) es rígido y al menos parcialmente translúcido. Como alternativa, se puede presionar una ubicación de muestra (4) (por ejemplo, un chip microfluídico) con una placa de metal que tiene aberturas sobre los compartimentos microfluídicos para permitir el paso de la radiación electromagnética. Como alternativa, aún se puede presionar una ubicación de muestra (4) (por ejemplo, un chip microfluídico) usando los bordes del tubo de luz (o de la sección de tubo de luz) de la presente invención.

10 En una realización, la presente invención proporciona un dispositivo de ciclado térmico que comprende: a) una ubicación de muestra (4); b) un tubo de luz (1) que comprende una sección de tubo de luz que comprende un primer extremo y un segundo extremo, en el que dicha sección de tubo de luz está configurada para homogeneizar la distribución de intensidad espacial de la radiación electromagnética por medio de reflexión, preferentemente la reflectancia es mayor del 50 %, aún más preferentemente mayor del 90 %; c) un primer medio de calentamiento (3) que es una fuente de calor por contacto, en el que dicho primer medio de calentamiento está configurado para llevar una muestra o muestras múltiples en dicha ubicación de la muestra a al menos aproximadamente una primera temperatura; d) un segundo medio de calentamiento (2) que es una fuente de radiación electromagnética, en el que dicho segundo miembro de calentamiento está configurado para llevar una muestra o para llevar simultáneamente muestras múltiples en dicha ubicación de muestra a una segunda temperatura dirigiendo radiación electromagnética al primer extremo de la sección del tubo de luz y la sección del tubo de luz está configurada para dirigir dicha radiación electromagnética a través de su segundo extremo a la ubicación de la muestra (4) y para homogeneizar una distribución de intensidad espacial de la radiación electromagnética por medio de reflexión; una fuente de luz (5), en el que dicha fuente de luz (5) es una fuente de excitación de fluorescencia; e) opcionalmente, medios para bloquear completamente la radiación electromagnética, preferentemente un obturador mecánico que bloquea completamente la radiación electromagnética cuando está cerrado; f) opcionalmente, medios de enfriamiento de dicha sección de tubo de luz (o medios de enfriamiento del tubo de luz), preferentemente medios de enfriamiento externo; g) opcionalmente, un filtro óptico de paso largo (12); h) opcionalmente, un filtro adicional (13); i) opcionalmente, un filtro adicional (14); j) opcionalmente, medios para mover la sección de tubo de luz (o medios para mover el tubo de luz) y para ejercer fuerza sobre la ubicación de muestra (4); k) opcionalmente, una placa situada entre la sección de tubo de luz (o el tubo de luz) y la ubicación de muestra (4).

30 En otra realización, la presente invención proporciona un dispositivo de ciclado térmico que comprende además: b) un tubo de luz que comprende una primera sección de tubo de luz al menos operable para recoger radiación electromagnética, preferentemente de al menos una lámpara halógena; c) una segunda sección de tubo de luz al menos operable para recoger excitación fluorescente y transmitir luz de emisión de fluorescencia, preferentemente dicha segunda sección de tubo de luz está configurada para homogeneizar la intensidad de excitación fluorescente; d) una tercera sección de tubo de luz al menos operable para iluminar dicha ubicación de la muestra (4) con radiación electromagnética y excitación fluorescente y para transmitir luz de emisión fluorescente a la segunda sección de tubo de luz, preferentemente dicha tercera sección de tubo de luz está configurada para homogeneizar la intensidad de excitación fluorescente; e) un filtro óptico configurado para reflejar la luz visible y transmitir radiación electromagnética; en el que al menos una sección de tubo de luz está configurada para homogeneizar la distribución de intensidad espacial de la luz y de la radiación electromagnética por medio de reflexión, preferentemente cada sección de tubo de luz está configurada para homogeneizar la distribución de intensidad espacial de la luz y de la radiación electromagnética por medio de reflexión, aún más preferentemente la reflectancia es mayor del 50 %, lo más preferentemente la reflectancia es mayor del 90 %; f) opcionalmente, medios para bloquear completamente la radiación electromagnética, preferentemente un obturador mecánico que bloquea completamente la radiación electromagnética cuando está cerrado; g) opcionalmente, medios de enfriamiento de al menos una sección de tubo de luz (o medios de enfriamiento del tubo de luz), preferentemente medios de enfriamiento externo; h) opcionalmente, un filtro óptico de paso largo (12); i) opcionalmente, un filtro adicional (13); j) opcionalmente, un filtro adicional (14); k) opcionalmente, medios para mover la sección de tubo de luz (o medios para mover el tubo de luz) y para ejercer fuerza sobre la ubicación de muestra (4); l) opcionalmente, una placa situada entre la tercera sección de tubo de luz (o el tubo de luz) y la ubicación de muestra (4). En otra realización, la presente invención proporciona el dispositivo de ciclado térmico de la presente invención que comprende además un tubo de luz (1), en el que dicho tubo de luz (1) comprende dichas primera, segunda y tercera secciones de tubo de luz.

55 En otra realización de la presente invención, una intensidad de excitación fluorescente se homogeneiza al menos mediante una tercera sección de tubo de luz, en la que una segunda sección de tubo de luz solo se configura preferentemente para homogeneizar dicha intensidad de excitación fluorescente.

60 En otra realización, la presente invención proporciona el dispositivo de ciclado térmico de la presente invención, que comprende además: un primer medio de calentamiento (3) que es una fuente de calor por contacto, en el que dicho primer medio de calentamiento está configurado para llevar una muestra o muestras múltiples en dicha ubicación de la muestra a al menos aproximadamente una primera temperatura; un segundo medio de calentamiento (2) que es una fuente de radiación electromagnética, en el que dicho segundo medio de calentamiento está configurado para llevar dicha muestra o muestras múltiples a una segunda temperatura; una fuente de luz (5), en el que dicha fuente de luz es una fuente de excitación de fluorescencia; y una cámara (8) configurada para detectar la fluorescencia emitida que proviene directamente de la ubicación de la muestra (4) transmitida por la sección del tubo de luz sin reflejarse en las paredes del tubo de luz, preferentemente dicha cámara es una cámara de detección de luz de

fluorescencia emitida y al menos un espejo dicroico (6, 7). En otra realización, la presente invención proporciona el dispositivo de ciclado térmico de la presente invención, en el que: a) dicha primera sección de tubo de luz es al menos operable para recoger radiación electromagnética de dicho segundo medio de calentamiento (2); b) dicha segunda sección de tubo de luz es al menos operable para recoger la excitación fluorescente de dicha fuente de luz (5) y transmitir una luz de emisión de fluorescencia desde dicha tercera sección de tubo de luz a dicha cámara (8); c) dicha tercera sección de tubo de luz es al menos operable para iluminar dicha ubicación de la muestra (4) con dicha radiación electromagnética y con dicha excitación fluorescente y para transmitir dicha luz de emisión fluorescente desde dicha ubicación de la muestra (4) a dicha segunda sección de tubo de luz. En otra realización, la presente invención proporciona el dispositivo de ciclado térmico de la presente invención, en el que al menos una de dichas primera, segunda o tercera secciones de tubo de luz está hecha de metal, preferentemente para facilitar el enfriamiento de dicha sección de tubo de luz, por ejemplo, el enfriamiento externo, y/o para proporcionar rigidez estructural que puede usarse para presionar dicha ubicación de muestra (4), por ejemplo, un chip microfluídico, contra el primer medio de calentamiento, por ejemplo, un bloque térmico.

En otra realización, la presente invención proporciona el dispositivo de ciclado térmico de la presente invención, en el que dicho tubo de luz (1) está hecho de metal, preferentemente para facilitar el enfriamiento de dicho tubo de luz, por ejemplo, el enfriamiento externo, y/o para proporcionar rigidez estructural que puede usarse para presionar dicha ubicación de muestra (4), por ejemplo, un chip microfluídico, contra el primer medio de calentamiento, por ejemplo, un bloque térmico.

En otra realización, la presente invención proporciona el dispositivo de ciclado térmico de la presente invención, en el que dicha tercera sección de tubo de luz o dicho tubo de luz (1) está configurada para presionar dicha ubicación de muestra (4) contra dicho medio de calentamiento por contacto (3). En otra realización, la presente invención proporciona el dispositivo de ciclado térmico de la presente invención, en el que dicho tubo de luz (1) está configurado para presionar dicha ubicación de muestra (4) contra dicho medio de calentamiento por contacto (3). En otra realización, la presente invención proporciona el dispositivo de ciclado térmico de la presente invención, en el que al menos dicha tercera sección de tubo de luz o tubo de luz (1) tiene una estructura rígida.

En otra realización más de la presente invención, el tubo de luz (preferentemente tubo de luz hueco) o la sección de tubo de luz (preferentemente sección de tubo de luz hueca) (por ejemplo, primera, segunda o tercera) de la presente invención es capaz de transmitir (o dirigir) luz (por ejemplo, excitación fluorescente desde la fuente de luz (5) y emisión fluorescente desde la ubicación de la muestra (4)) en ambas direcciones (por ejemplo, hacia y desde la ubicación de la muestra (4)), lo cual es particularmente ventajoso para la detección de fluorescencia. Una ventaja particular del uso de un tubo de luz hueco de la presente invención, aunque el tubo de luz homogeneiza la distribución de intensidad espacial de la excitación de fluorescencia, es que siempre es posible observar directamente la fluorescencia emitida desde la ubicación de la muestra (4) (por ejemplo, un chip microfluídico) (por ejemplo, sin reflejos de los lados del tubo de luz) si se mira directamente a través del tubo de luz.

En otra realización de la invención, el ciclado térmico es un ciclado térmico de PCR (preferentemente un ciclado térmico de PCR en tiempo real o un ciclado térmico de PCR digital). En otra realización de la invención, un dispositivo de ciclado térmico es un dispositivo de ciclado térmico de PCR (preferentemente un dispositivo de ciclado térmico de PCR en tiempo real o un dispositivo de ciclado térmico de PCR digital). En otra realización de la invención, una muestra (o muestras) es una muestra de PCR (o muestras de PCR) (por ejemplo, mezclas de reacción de PCR) (preferentemente muestras de PCR en tiempo real o muestras de PCR digital). La PCR en tiempo real es extremadamente sensible al ciclado térmico no uniforme y, por lo tanto, la uniformidad del ciclado térmico es crucial para un procedimiento (o método) de PCR en tiempo real preciso y fiable. En otra realización más de la invención, un dispositivo de la presente invención comprende una unidad de detección de fluorescencia. La uniformidad (u homogeneidad) de la iluminación también es crucial para la detección de fluorescencia (por ejemplo, en PCR en tiempo real), porque permite comparar cuantitativamente intensidades de fluorescencia entre muestras en diferentes ubicaciones en el recipiente. En otra realización de la invención, el uso del tubo de luz de la presente invención (por ejemplo, tubo de metal hueco) permite usar elementos ópticos, por ejemplo, como espejos dicroicos, dentro del tubo de luz, lo que crea una barrera de seguridad entre la unidad de detección de fluorescencia y una fuente de radiación electromagnética. En una realización adicional de la invención, el espejo dicroico (7) se usa para reflejar la radiación electromagnética mientras deja pasar la luz de fluorescencia de excitación y de emisión. En otra realización de la invención, el espejo dicroico (6) se usa para reflejar la luz de excitación y deja pasar la luz de emisión. En otra realización de la invención, el filtro de emisión (9) se usa para bloquear adicionalmente la luz de excitación parásita mientras deja pasar la luz de emisión. En otra realización de la invención, el dispositivo de la presente invención comprende opcionalmente un filtro adicional (10), en el que dicho filtro adicional refleja longitudes de onda por debajo del infrarrojo (figura 1). En otra realización de la invención, el filtro (10) se usa para retener la función del tubo de luz a pesar del orificio en su pared. En otra realización de la presente invención, el dispositivo de la presente invención comprende un espejo dicroico (6) y/o un filtro de emisión (9), que son filtros de fluorescencia multibanda para permitir la detección simultánea de muchos colorantes, por ejemplo, el conjunto de filtros DA/FI/TR/Cy5-A-000 de Semrock, que permite la detección de DAPI, FITC, TRITC y Cy5. En otra realización de la presente invención, el dispositivo de la presente invención comprende espejos dicroicos multibanda para la detección multiplexada de productos de amplificación por PCR, eliminando la necesidad de múltiples espejos dicroicos de banda única y de mecano-óptica precisa para alinear la luz de múltiples fuentes de LED. En otra realización de la invención, la fuente de luz (5) (por

ejemplo, fuente de luz de excitación de fluorescencia) es un LED RGB (diodos emisores de luz roja, verde y azul). En otra realización de la invención, la fuente de luz (5) (por ejemplo, fuente de luz de excitación de fluorescencia) es una multitud de fuentes de luz de diferentes tipos, que no compromete la calidad de la iluminación porque la no uniformidad de la fuente de luz se reduce completamente mediante el uso de tubos de luz de la presente invención, por ejemplo, tubos de luz de metal. En otra realización preferida más de la invención, el dispositivo de la presente invención comprende filtros multibanda (9) que permiten la detección de un colorante fluorescente sensible a la temperatura, por ejemplo Rodamina B, permitiendo así medir la temperatura de la muestra en tiempo real durante la PCR. En otra realización, la invención proporciona un método para controlar la temperatura de muestras en tiempo real durante el ciclado térmico, comprendiendo dicho método: mantener la fuente de excitación de fluorescencia (5) encendida o encenderla periódicamente mientras se leen simultáneamente los cambios de excitación de fluorescencia causados por el cambio de temperatura usando la cámara (8) durante el ciclado térmico. Las lecturas de temperatura de las muestras permiten establecer los tiempos de calentamiento y enfriamiento descritos en los métodos de la presente invención. En otra realización, la presente invención proporciona un método para la amplificación uniforme, simultánea y ultrarrápida de muestras (por ejemplo, muestras múltiples) con PCR, comprendiendo dichas muestras ácido nucleico o fragmentos del mismo, combinada con la detección en tiempo real de productos amplificados (por ejemplo, productos de PCR) usando colorantes intercalantes tales como, por ejemplo, SybrGreen. En otra realización, la presente invención proporciona un método para la amplificación uniforme y simultánea de muestras con PCR, comprendiendo dichas muestras un ácido nucleico o un fragmento del mismo, combinada con la detección en tiempo real del producto amplificado, comprendiendo dicho método:

(a) mantener la temperatura del primer medio de calentamiento (3) a una temperatura específica (por ejemplo, a 55 °C o, por ejemplo, 55 °C±10 °C o, por ejemplo, 55 °C±15 °C), en donde dicha temperatura específica es inferior o igual a la temperatura de renaturalización de los cebadores de PCR;

(b) mientras se mantiene dicha temperatura constante, encender la fuente de radiación electromagnética (2) a una potencia constante durante un período de tiempo especificado (por ejemplo, 15 W de potencia total durante 2 segundos), en el que dichas muestras se calientan de manera uniforme y simultánea hasta que alcanzan la temperatura de desnaturalización del ADN;

(c) mientras se sigue manteniendo constante la temperatura del primer medio de calentamiento (3), apagar la fuente de radiación electromagnética (2) durante un período de tiempo especificado (por ejemplo, 5 segundos), en el que se enfrían dichas muestras (preferentemente se enfrían rápidamente dichas muestras, por ejemplo, a una velocidad de 6 °C/segundo o a una velocidad de 15 °C/segundo); preferentemente repetir las etapas (b)-(c) al menos 15 veces, más preferentemente repetir las etapas (b)-(c) al menos 20 veces, lo más preferentemente repetir las etapas (b)-(c) al menos 30 veces, aún más preferentemente repetir las etapas (b)-(c) al menos 40 veces; aún más preferentemente repetir las etapas (b)-(c) al menos 60 veces;

(d) después de un período de tiempo especificado (por ejemplo, 4 segundos desde el final de la fase b)) encender la fuente de excitación de fluorescencia, en donde dichas muestras se excitan de manera uniforme y simultánea, y simultáneamente se realiza la detección de luz de fluorescencia emitida usando la cámara (8).

En otra realización de la presente invención, se crea un gradiente térmico constante en el primer medio de calentamiento (3) (por ejemplo, un bloque de calentamiento) durante la PCR, (por ejemplo, el lado izquierdo está configurado para estar a 50 °C y el lado derecho a 60 °C con temperaturas intermedias entre ellos). Durante el ciclado de PCR, una fuente de radiación electromagnética proporciona la misma cantidad de potencia a cada muestra, pero la temperatura del primer medio de calentamiento (3) (por ejemplo, un bloque de calentamiento) es diferente para cada una de ellas, por lo que experimentan diferentes condiciones de ciclado (por ejemplo, diferentes temperaturas de renaturalización). Después de realizar la PCR, un usuario puede revisar qué condiciones de ciclado han sido óptimas (por ejemplo, verificadas por una gran cantidad de un producto específico) y luego usar la temperatura óptima (por ejemplo, temperatura de renaturalización óptima) del primer medio de calentamiento (3) (por ejemplo, un bloque de calentamiento) para futuros experimentos. En otra realización de la presente invención, se ejecutan en paralelo en el primer medio de calentamiento (3) diferentes temperaturas de PCR (es decir, diferentes temperaturas de renaturalización en un método de la presente invención). En otra realización de la invención, la temperatura del primer medio de calentamiento (3) se usa para eliminar (o compensar) cualquier falta de uniformidad en la temperatura de la muestra en la ubicación de la muestra causada por no uniformidades residuales en la intensidad de distribución de radiación en la ubicación de la muestra mediante la introducción de cambios espaciales en la temperatura del primer medio de calentamiento (3) (por ejemplo, un elemento de calentamiento). En otra realización de los métodos de la invención, las etapas (b)-(c) comprenden un ciclo de PCR y se repiten periódicamente hasta que el recuento del ciclo alcanza el número especificado (por ejemplo, deseado). En otra realización de la invención, la ubicación de la muestra (4) (por ejemplo, un recipiente de muestra o un soporte de muestra) es un chip microfluídico que contiene multitud de compartimentos. En una realización adicional, es una microplaca de PCR, que, por ejemplo, es pipeteada por un operario experto o por un robot. La invención está respaldada además por los siguientes ejemplos y figuras sin limitarse a dichas figuras y ejemplos.

Modos de llevar a cabo la invención, incluido un mejor modo de llevar a cabo la invención:

Ejemplos de la invención

Las figuras 1-4 y 9-11 proporcionan realizaciones preferidas no limitantes a modo de ejemplo de la presente invención:

La figura 1 describe un dispositivo a modo de ejemplo de la presente invención que comprende: un primer medio de calentamiento (3), en el que el primer medio de calentamiento (3) es un bloque de calentamiento, una ubicación de muestra (4), un tubo de luz (1), un segundo medio de calentamiento (2), en el que el segundo medio de calentamiento (2) es una fuente de radiación, una fuente de luz (5), una cámara (8), un espejo dicróico (6), un espejo dicróico (7), en el que al menos los espejos dicróicos (6, 7) están colocados dentro del tubo de luz (1), un filtro de fluorescencia (9) y un filtro adicional (10), en el que dicho filtro adicional (10) refleja longitudes de onda por debajo del infrarrojo.

La figura 2 describe un dispositivo a modo de ejemplo de la presente invención que comprende: un primer medio de calentamiento (3), en el que el primer medio de calentamiento (3) es un bloque de calentamiento, una ubicación de muestra (4), un tubo de luz (1), un segundo medio de calentamiento (2), en el que el segundo medio de calentamiento (2) es una fuente de radiación, una fuente de luz (5), una cámara (8), un espejo dicróico (6) y un espejo dicróico (7), en el que al menos los espejos dicróicos (6, 7) están colocados dentro del tubo de luz (1).

La figura 3 describe un mejor modo de llevar a cabo la invención - un dispositivo a modo de ejemplo de la presente invención que comprende: un primer medio de calentamiento (3), en el que el primer medio de calentamiento (3) es un bloque de calentamiento, una ubicación de muestra (4), un tubo de luz (1), un segundo medio de calentamiento (2), en el que el segundo medio de calentamiento (2) es una fuente de radiación, una fuente de luz (5), una cámara (8), un espejo dicróico (6), un espejo dicróico (7), en el que los espejos dicróicos (6, 7) están colocados dentro del tubo de luz (1), un filtro de fluorescencia (9), un filtro adicional (10), en el que dicho filtro adicional (10) refleja longitudes de onda por debajo del infrarrojo, y un filtro de excitación (11).

La figura 4 describe un dispositivo a modo de ejemplo de la presente invención que comprende: un primer medio de calentamiento (3), en el que el primer medio de calentamiento (3) es un bloque de calentamiento, una ubicación de muestra (4), un tubo de luz (1), un segundo medio de calentamiento (2), en el que el segundo medio de calentamiento (2) es una fuente de radiación, una fuente de luz (5), una cámara (8), un espejo dicróico (6), un espejo dicróico (7), en el que al menos los espejos dicróicos (6, 7) están dentro del tubo de luz (1), un filtro de fluorescencia (9) y un filtro de excitación (11).

La figura 9 describe un dispositivo a modo de ejemplo de la presente invención que comprende: un primer medio de calentamiento (3), en el que el primer medio de calentamiento (3) es un bloque de calentamiento, una ubicación de muestra (4), un tubo de luz (1) de estructura rígida, preferentemente hecho de metal grueso, un segundo medio de calentamiento (2), en el que el segundo medio de calentamiento (2) es una fuente de radiación, una fuente de luz (5), una cámara (8) y un filtro óptico de paso largo (12), en el que el filtro óptico de paso largo (12) está dentro del tubo de luz (1) y situado entre la fuente de radiación (2) y la ubicación de la muestra (4).

La figura 10 describe un dispositivo a modo de ejemplo de la presente invención que comprende: un primer medio de calentamiento (3), en el que el primer medio de calentamiento (3) es un bloque de calentamiento, una ubicación de muestra (4), un tubo de luz (1) de estructura rígida, preferentemente hecho de metal grueso, en el que dicho tubo de luz (1) tiene al menos una abertura en su pared, dicha abertura situada frente a un filtro óptico (13), un segundo medio de calentamiento (2), en el que el segundo medio de calentamiento (2) es una fuente de radiación, una fuente de luz (5), una cámara (8), un filtro óptico de paso largo (12), en el que el filtro óptico de paso largo (12) está dentro del tubo de luz (1) y situado entre la fuente de radiación (2) y la ubicación de la muestra (4), un filtro óptico (13), en el que el filtro óptico (13) está dentro del tubo de luz (1), situado frente a la abertura en la pared del tubo de luz (1) y refleja la radiación IR y deja pasar la luz visible y un filtro óptico (14), en el que el filtro óptico (14) es del mismo tipo que el filtro óptico (13), situado en la abertura en la pared del tubo de luz (1) y está configurado para aumentar la simetría óptica del tubo de luz (1) y para aumentar la uniformidad de la radiación.

Las figuras 5-8 y 11 describen análisis a modo de ejemplo de curvas de fusión de muestras amplificadas en el dispositivo de la presente invención:

Ejemplo 1 de amplificación por PCR.

El uso de un tubo de luz como se describe en el presente documento proporciona una forma altamente eficiente y rentable de lograr una distribución uniforme y simultánea y ultrarrápida de energía electromagnética a las muestras y la iluminación de dichas muestras con luz con el fin de detectarlas. El uso del dispositivo (por ejemplo, como se describe en la figura 1), el tubo de luz y los métodos de la presente invención demostraron un ciclo térmico uniforme, simultáneo y ultrarrápido de 42 muestras de PCR de dos tamaños diferentes. El tiempo requerido para cada ciclo de PCR que consiste en las etapas b)-c) del método fue de solo 3,7 segundos o 7 segundos, lo que se verificó con éxito mediante análisis de seguimiento de la presencia de un producto de amplificación por PCR específico (por ejemplo, análisis de curva de fusión). Las curvas de fusión muestran la fusión de las 42 muestras (figura 5), de una fila de 7 muestras (figura 6) y una curva de fusión única de una muestra (figura 7) que se amplificaron simultáneamente en el dispositivo descrito en la presente invención. La PCR se realizó usando el plásmido pJET con el gen clonado LepA de *Mycobacterium smegmatis* como plantilla. El fragmento amplificado tenía 126 pb de longitud y contenía el 58 % de los pares de GC. Cebador directo (FP1-SEQ ID N.º 1): tcttgccctcttctgcttc, cebador inverso (RP1-SEQ ID N.º 2):

cgcaatgattctcgagccgatc. El tiempo del ciclo de PCR fue de 7 segundos y se realizaron 60 ciclos. El volumen inicial de la muestra fue igual a 0,65 µl y se diluyó a 10 µl para el análisis de la curva de fusión que se llevó a cabo en el Sistema de PCR en tiempo real Applied Biosystems 7500.

5 **Ejemplo 2 de amplificación por PCR.**

Otra curva de fusión muestra la fusión de la misma diana amplificada con un tiempo de ciclo de 3,7 segundos, el volumen de muestra fue de 3 µl y la muestra se diluyó como en el ejemplo anterior a 10 µl (figura 8). Un ligero cambio en la temperatura de fusión es causado por cambios en la composición del tampón debido a la dilución.

10

Ejemplo 3 de amplificación por PCR.

Se llevó a cabo otro experimento de amplificación por PCR en el dispositivo de acuerdo con la figura 9, que permitió obtener la fusión directamente en el chip. La PCR se realizó usando el plásmido pJET con un fragmento del gen GAPDH humano clonado. El fragmento amplificado tenía 125 pb de longitud y contenía el 53 % de los pares de GC. El cebador directo fue (FP2-SEQ ID N.º 3): TCTCCTCTGACTTCAACAGCGAC, cebador inverso (RP2-SEQ ID N.º 4): CCCTGTTGCTGTAGCCAAATTC. El tiempo de calentamiento fue de 1,75 segundos (por ejemplo, con halógeno encendido), el tiempo de enfriamiento fue de 5 segundos y se realizaron 60 ciclos. La figura 11 (eje y: medición de fluorescencia, eje x: temperatura) muestra el análisis de la curva de fusión de las 55 muestras que se amplificaron en el chip en el dispositivo de acuerdo con la figura 9.

15

20

Todas las curvas de fusión muestran un producto específico de amplificación por PCR sin dímeros de cebadores (por ejemplo, figuras 5-8, 11). Por lo tanto, el dispositivo de la presente invención (por ejemplo, como se describe en las figuras 1 y 9) produjo productos específicos de amplificación por PCR.

25

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Curiosity Diagnostics Sp. z o.o.

30

<120> Dispositivo para el ciclado térmico simultáneo y uniforme de muestras y usos del mismo

<130> CURD001PWQ

<150> EP 14162212.6

35

<151> 2014-03-28

<160> 4

<170> Versión de patente 3.5

40

<210> 1

<211> 20

<212> ADN

<213> *Mycobacterium smegmatis*

45

<400> 1

tcttgcctc tttctgctc 20

<210> 2

50

<211> 22

<212> ADN

<213> *Mycobacterium smegmatis*

<400> 2

55

cgcaatgatt ctcgagccga tc 22

<210> 3

<211> 23

<212> ADN

60

<213> *Homo sapiens*

<400> 3

tctcctctga ctcaacagc gac 23

65

<210> 4

<211> 22

ES 2 770 734 T3

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 4

5 ccctgttgct gtagc caaat tc 22

REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo de ciclado térmico que comprende:
 una ubicación de muestra (4);
- 5 una fuente de luz (5), en el que dicha fuente de luz (5) es una fuente de excitación de fluorescencia;
 un tubo de luz (1) que comprende una sección de tubo de luz, comprendiendo la sección de tubo de luz un primer extremo y un segundo extremo;
 un primer medio de calentamiento (3) que es una fuente de calor por contacto, en el que dicho primer medio de calentamiento está configurado para llevar una muestra o muestras múltiples en dicha ubicación de muestra (4) a al menos aproximadamente una primera temperatura;
 un segundo medio de calentamiento (2) que es una fuente de radiación electromagnética, en el que dicho segundo miembro de calentamiento (2) está configurado para llevar una muestra o para llevar simultáneamente muestras múltiples en dicha ubicación de muestra (4) a una segunda temperatura dirigiendo la radiación electromagnética al primer extremo de la sección del tubo de luz y la sección del tubo de luz está configurada para dirigir dicha radiación electromagnética a través de su segundo extremo a la ubicación de la muestra (4) y para homogeneizar una distribución de intensidad espacial de la radiación electromagnética por medio de reflexión;
 al menos un espejo dicróico (6, 7); y
 una cámara (8) configurada para detectar la fluorescencia emitida que proviene directamente de la ubicación de la muestra (4) transmitida por la sección del tubo de luz sin reflejarse en las paredes del tubo de luz.
- 10
 15
 20
2. El dispositivo de ciclado térmico de la reivindicación 1, en el que dicha cámara (8) comprende un objetivo que solo que la luz provenga directamente de la ubicación de la muestra (4), es decir, sin que atravesase ninguna luz reflejada en las paredes del tubo de luz.
- 25
3. El dispositivo de ciclado térmico de la reivindicación 1 o 2, en el que dicho segundo medio de calentamiento (2) es una fuente de radiación electromagnética infrarroja.
4. El dispositivo de ciclado térmico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho tubo de luz (1) está hecho de metal.
- 30
5. El dispositivo de ciclado térmico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho tubo de luz (1) está configurado para presionar dicha ubicación de muestra (4) contra dicha fuente de calor por contacto (3).
- 35
6. El dispositivo de ciclado térmico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho tubo de luz (1) está configurado para iluminar simultáneamente dichas muestras múltiples en dicha ubicación de muestra (4) con luz durante el ciclado térmico por medio de reflexión.
7. El dispositivo de ciclado térmico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicho tubo de luz (1) tiene una sección transversal seleccionada del grupo que consiste en: sección transversal rectangular, cuadrada y hexagonal.
- 40
8. El dispositivo de ciclado térmico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende además al menos un filtro de fluorescencia (9), en el que dicho filtro de fluorescencia (9) está configurado para medir los cambios de intensidad de fluorescencia de un colorante sensible a la temperatura agregado a la muestra, preferentemente dicho colorante sensible a la temperatura es Rodamina B, más preferentemente dicho filtro de fluorescencia (9) es un filtro multibanda.
- 45
9. Un uso del dispositivo de ciclado térmico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para el ciclado térmico uniforme y simultáneo de muestras, preferentemente para el ciclado térmico de muestras uniforme, simultáneo y ultrarrápido.
- 50
10. Un uso del dispositivo de ciclado térmico de acuerdo con la reivindicación 8 para medir la temperatura de las muestras en tiempo real.
- 55
11. Método para realizar ciclados térmicos usando un dispositivo de ciclado térmico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, comprendiendo dicho método:
- 60 dirigir dicha radiación electromagnética a dicha ubicación de muestra (4) usando el segundo medio de calentamiento (2) y usando la homogeneización de la distribución de intensidad espacial de la radiación electromagnética;
 iluminar dicha ubicación de muestra (4) con luz durante el ciclado térmico usando la fuente de luz (5); y realizar la detección de fluorescencia en tiempo real usando la cámara (8).
- 65
12. El método de la reivindicación 11 para la amplificación uniforme y simultánea de muestras con PCR, en el que la ubicación de muestra (4) comprende muestras múltiples y dichas muestras comprenden un ácido nucleico o un fragmento del mismo, combinada con la detección en tiempo real del producto amplificado, comprendiendo dicho

método:

- 5 a) mantener la temperatura del primer medio de calentamiento (3) a una temperatura específica, en donde dicha temperatura específica es inferior o igual a la temperatura de renaturalización de los cebadores de PCR;
- b) mientras se mantiene dicha temperatura constante, encender una fuente de radiación electromagnética (2) a una potencia constante durante un período de tiempo especificado, en el que dichas muestras se calientan de manera uniforme y simultánea hasta que alcanzan la temperatura de desnaturalización del ADN;
- 10 c) mientras se sigue manteniendo constante la temperatura del primer medio de calentamiento (3), apagar la fuente de radiación electromagnética (2) durante un período de tiempo especificado, en el que dichas muestras se enfrían; preferentemente repetir las etapas (b)-(c) al menos 15 veces, más preferentemente repetir las etapas (b)-(c) al menos 20 veces, lo más preferentemente repetir las etapas (b)-(c) al menos 30 veces, aún más preferentemente repetir las etapas (b)-(c) al menos 40 veces;
- 15 d) después de un período de tiempo especificado, encender la fuente de excitación de fluorescencia (5), en donde dichas muestras se excitan de manera uniforme y simultánea, y simultáneamente se realiza la detección de luz de fluorescencia emitida usando la cámara (8).

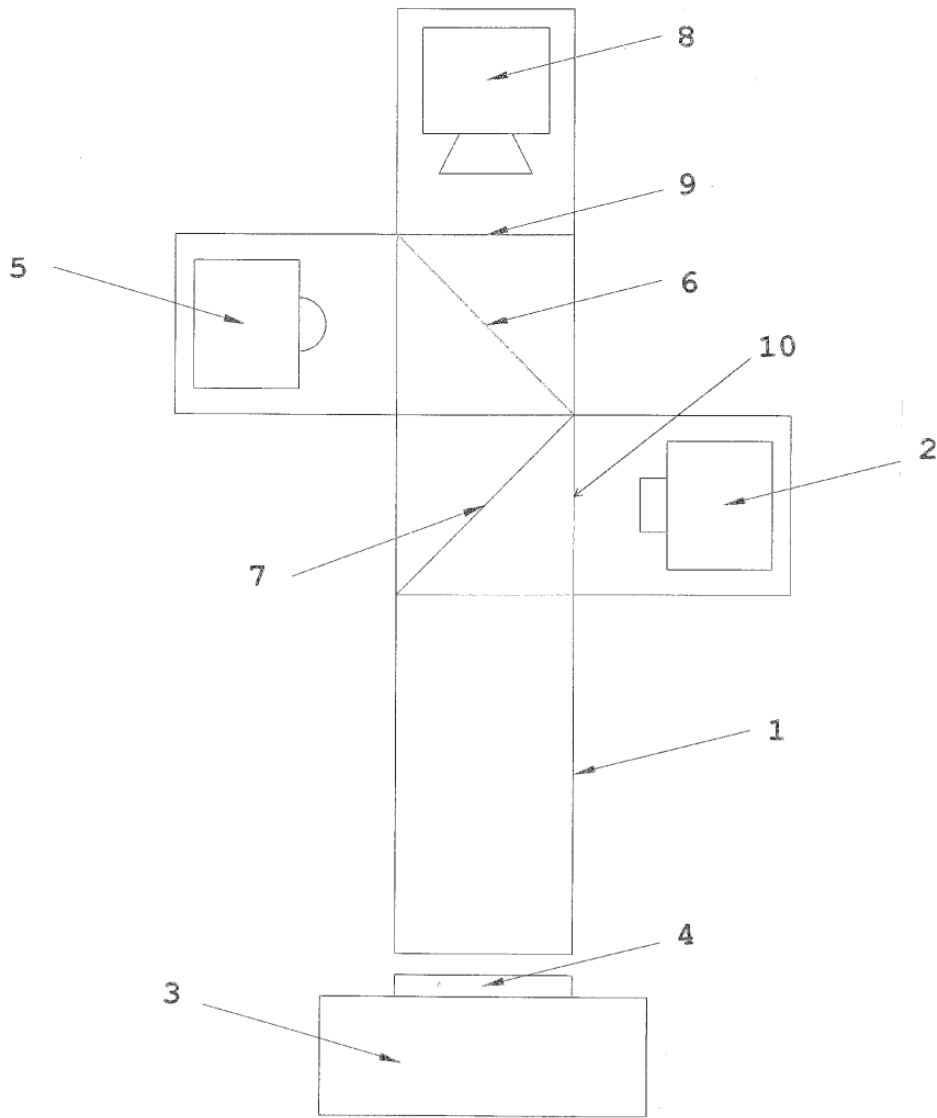


Fig. 1

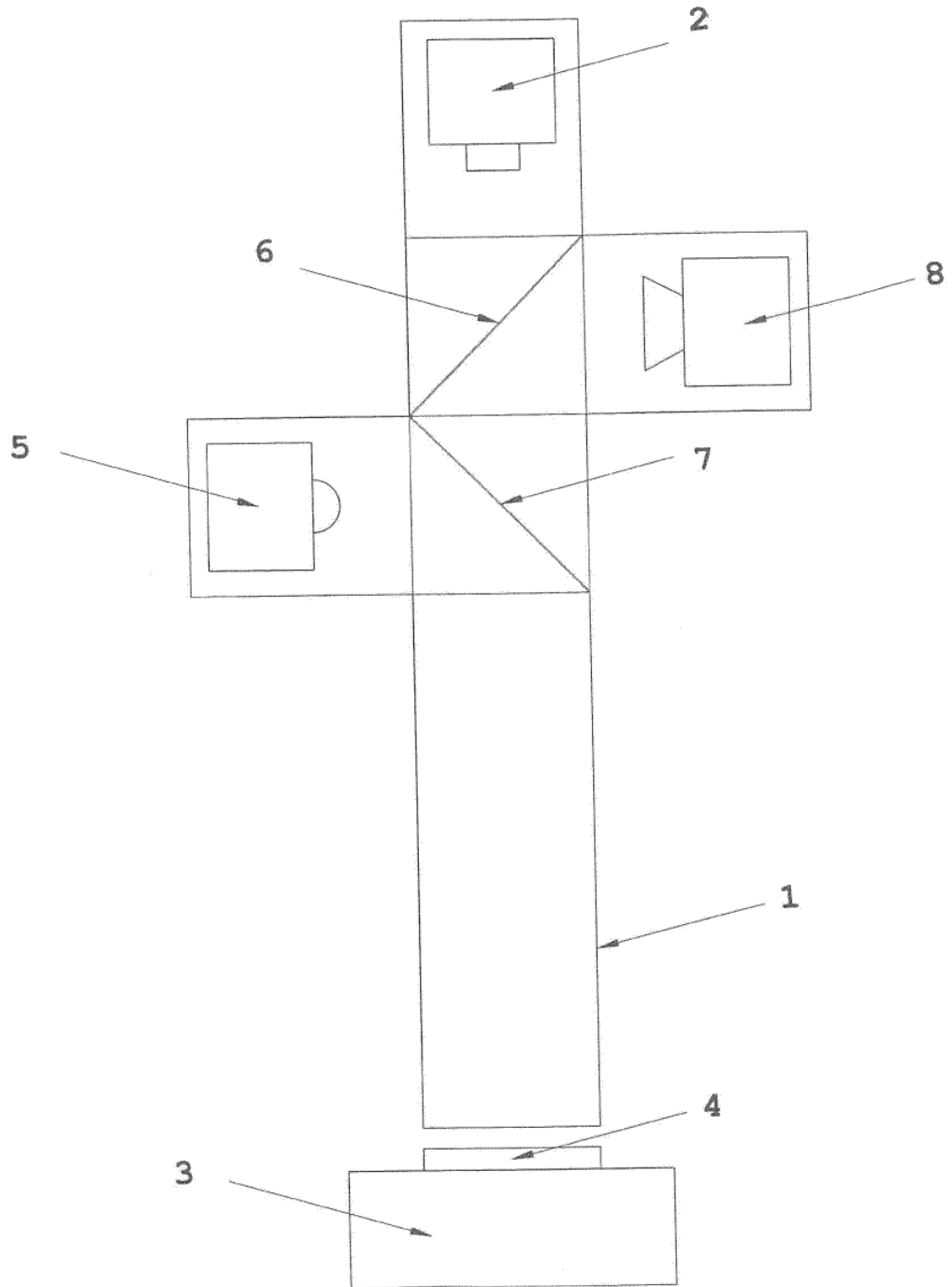


Fig. 2

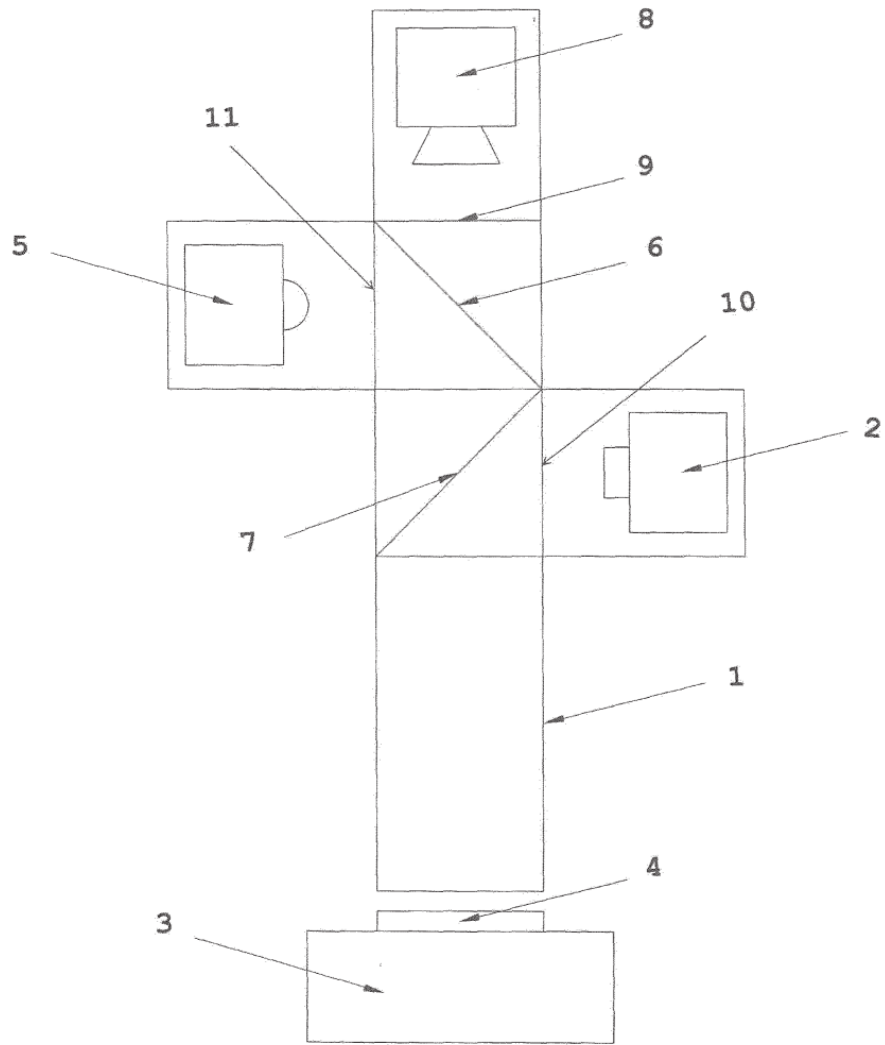


Fig. 3

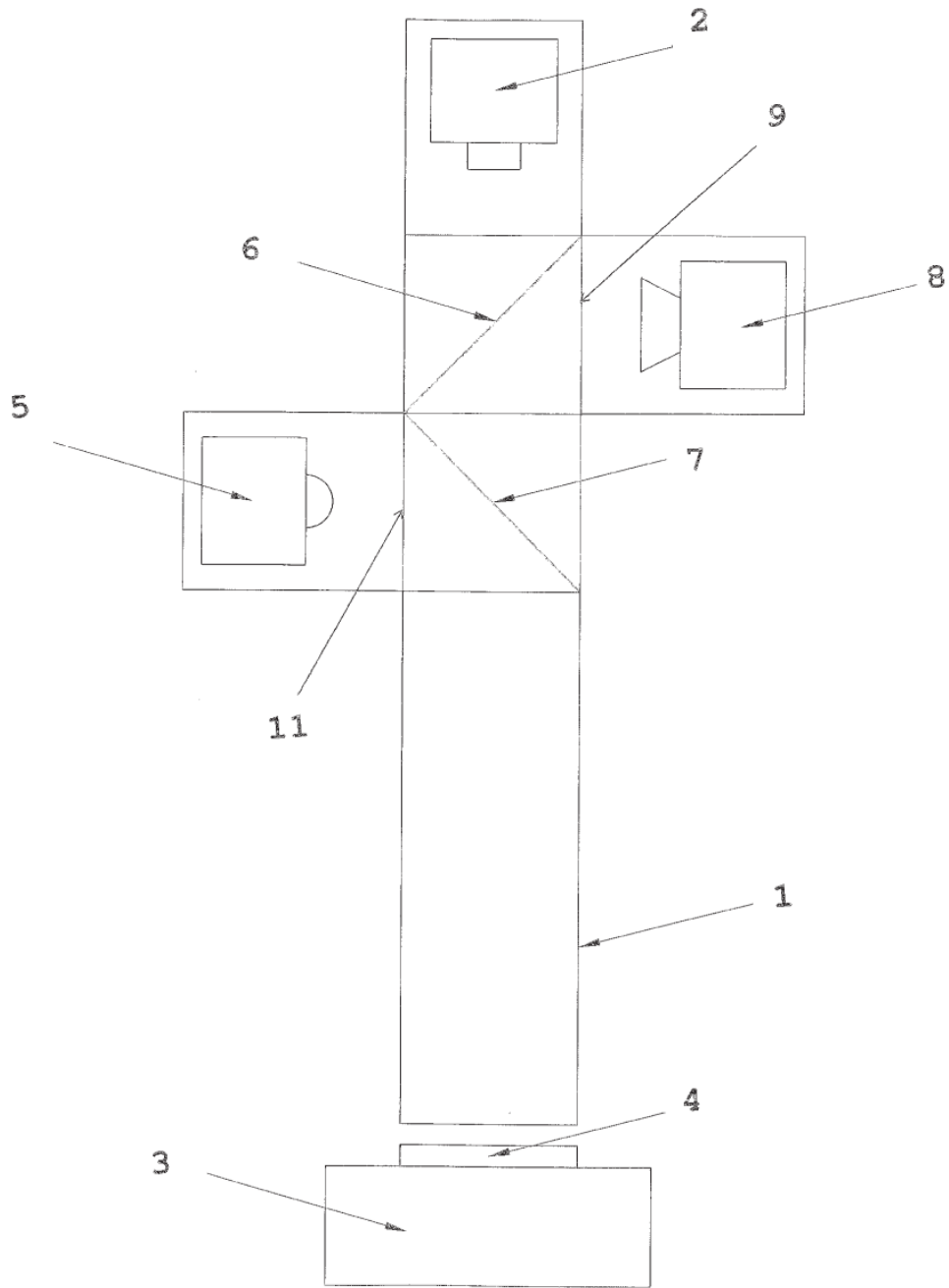


Fig. 4

Curva de fusión

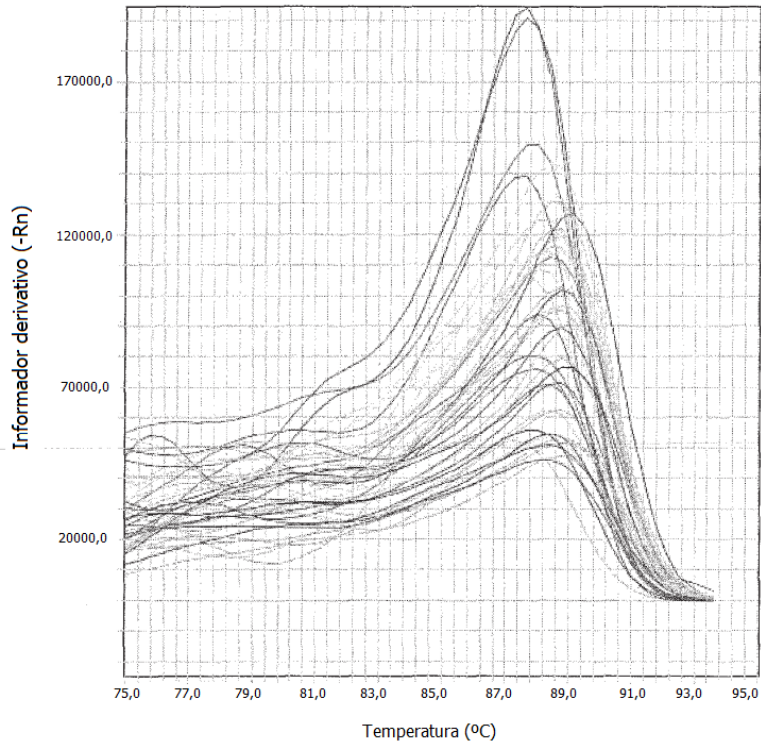


Fig. 5

Curva de fusión

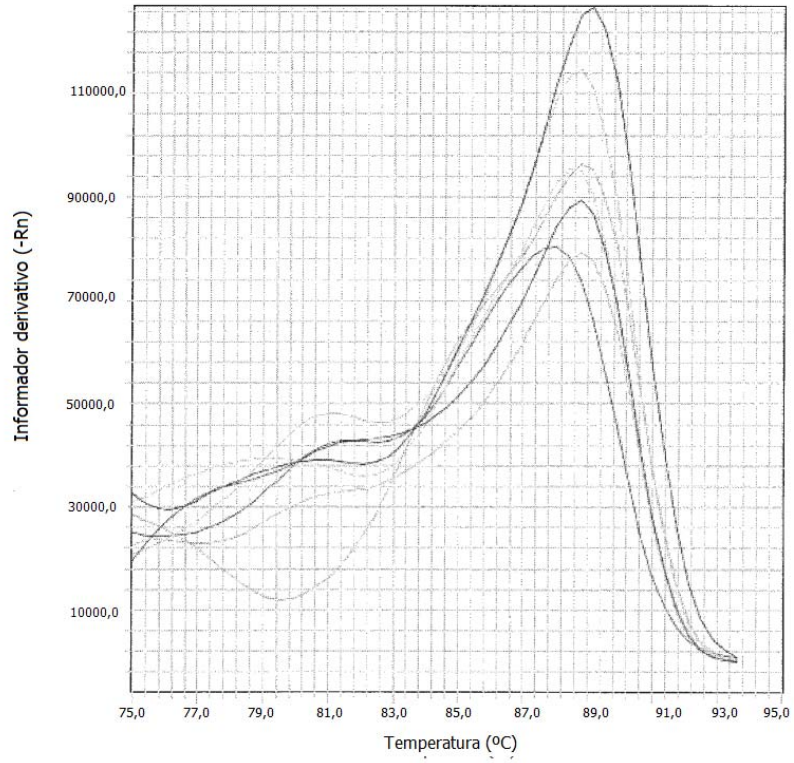


Fig. 6

Curva de fusión

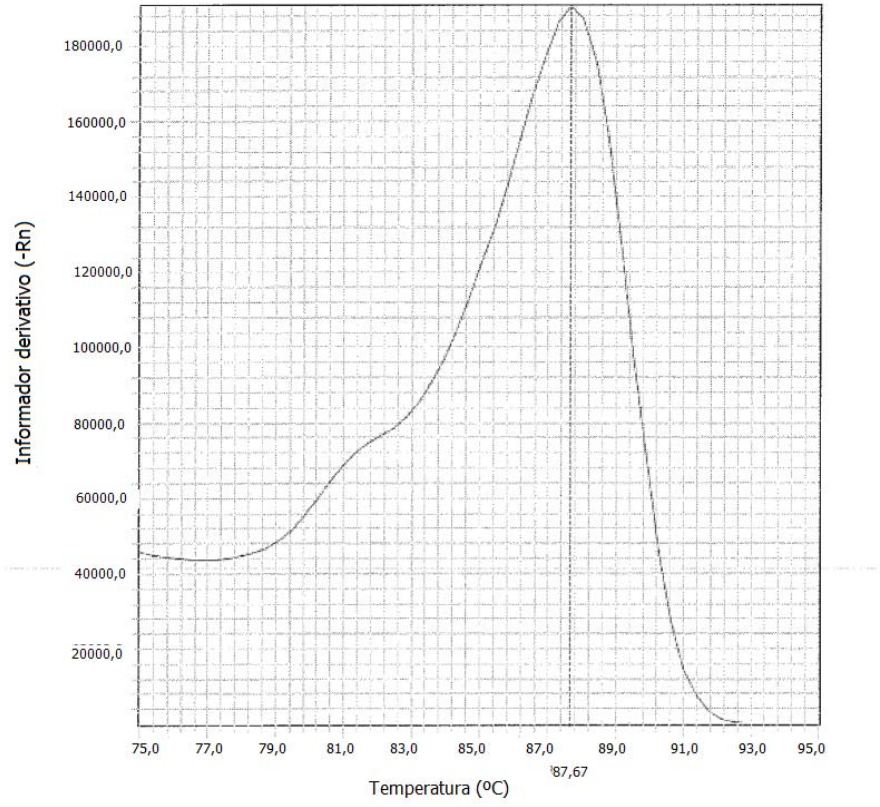


Fig. 7

Curva de fusión

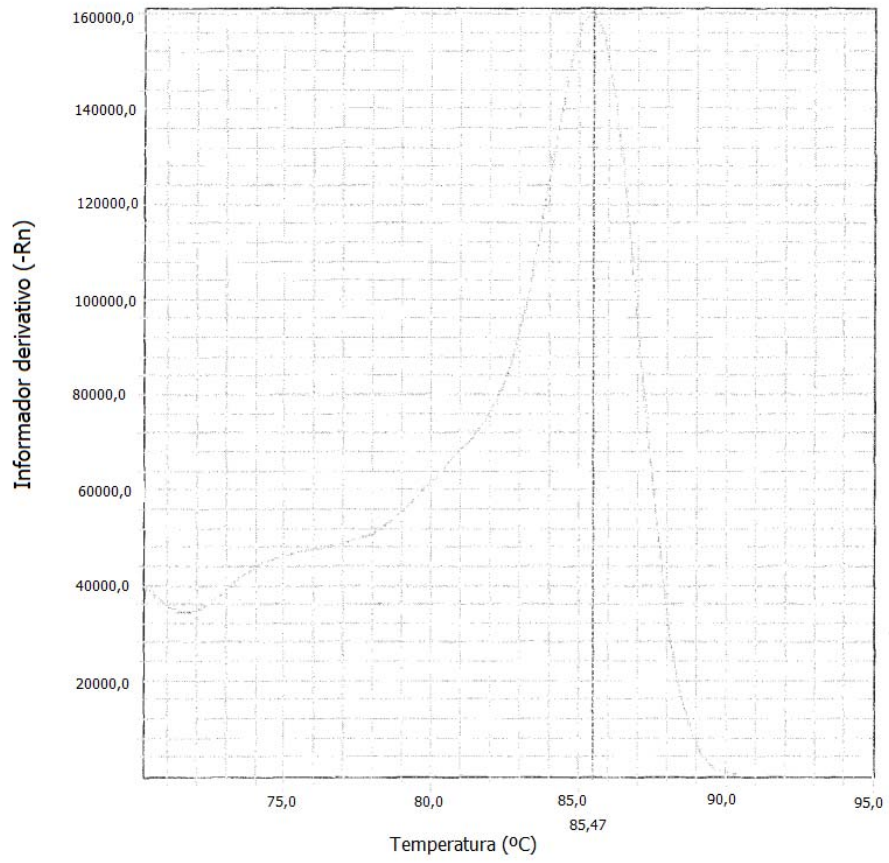


Fig. 8

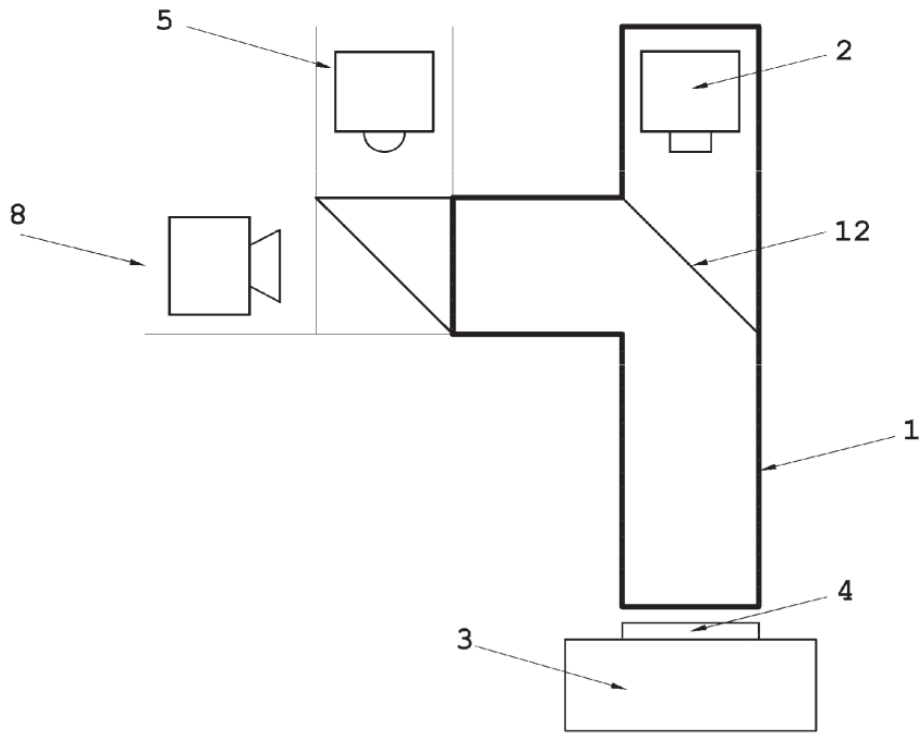


Fig. 9

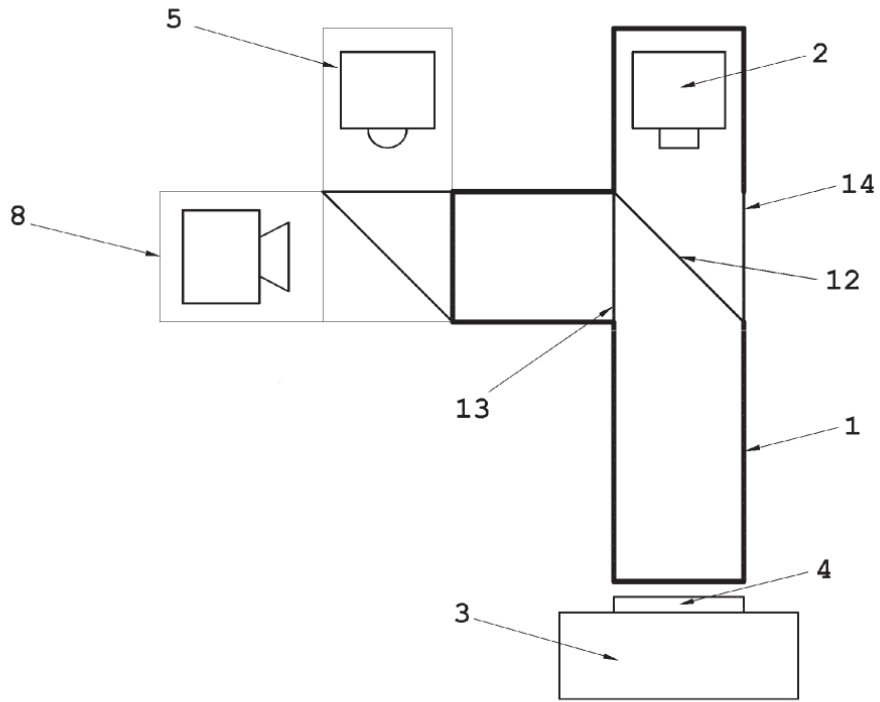


Fig. 10

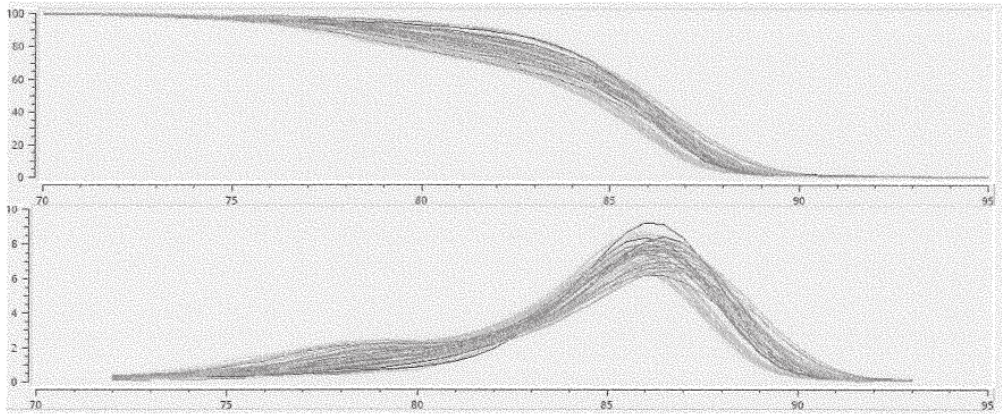


Fig. 11