



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 304 573**

(51) Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)

B01L 7/00 (2006.01)

B01L 9/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **04022352 .1**

(86) Fecha de presentación : **04.06.1997**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1493826**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **05.01.2005**

(54) Título: **Recipiente para llevar a cabo y controlar procesos biológicos.**

(30) Prioridad: **04.06.1996 US 658993**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.10.2008

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.10.2008

(73) Titular/es: **University of Utah Research Foundation
Technology of Transfer Office
615 Arapeen Drive, Suite 310
Salt Lake City, Utah 84108-1254, US**

(72) Inventor/es: **Wittwer, Carl T. y
Ririe, Kirk M.**

(74) Agente: **Durán Moya, Luis Alfonso**

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

Recipiente para llevar a cabo y controlar procesos biológicos.

5 Antecedentes

1. Sector técnico al que pertenece la invención

La presente invención se refiere de modo general a aparatos que se utilizan para llevar a cabo procesos biológicos, tales como la reacción en cadena de la polimerasa. De manera más específica, la presente invención se refiere a recipientes que contienen material biológico mientras se realiza la amplificación de ácidos nucleicos y sus usos.

2. Antecedentes técnicos

En numerosas áreas industriales, de la tecnología y de la investigación existe la necesidad de someter de manera fiable y reproducible ciertas muestras a ciclos térmicos. La necesidad de someter una muestra a ciclos térmicos repetidos es particularmente aguda en aplicaciones de biotecnología. En el sector de la biotecnología, es deseable frecuentemente calentar y enfriar repetidamente pequeñas muestras de materiales a lo largo de un corto período de tiempo. Uno de los procesos biológicos que es llevado a cabo regularmente es la amplificación cíclica de ADN.

La amplificación cíclica de ADN utilizando polimerasa de ADN termoestable permite una amplificación automatizada de ADN de cebador específico, conocida ampliamente como “reacción de la cadena de polimerasa” o “PCR”. La automatización de este procedimiento requiere ciclos térmicos precisos y controlados de las mezclas de reacción usualmente contenidas en una serie de contenedores. Con anterioridad, el contenedor preferente ha sido un tubo micrófugo estándar de material plástico.

Se han utilizado bloques térmicos, metálicos, programables, de tipo comercial con anterioridad para llevar a cabo los ciclos de temperatura de muestras en tubos micrófugos según la variación deseada de temperatura con respecto al tiempo. No obstante, la imposibilidad de ajustar de manera rápida y exacta la temperatura de los bloques térmicos en una amplia gama de temperaturas en un corto período de tiempo, ha hecho poco deseable la utilización de dispositivos del tipo de bloques térmicos como sistema de control térmico cuando se llevan a cabo procesos tales como la reacción de la cadena de polimerasa.

Además, los tubos micrófugos que se han utilizado de modo general tienen desventajas. El material de los tubos micrófugos, su grosor de paredes y la geometría de los tubos micrófugos es un inconveniente para el calentamiento y enfriamiento rápidos de las muestras contenidas en los mismos. El material plástico y el grosor de pared de los tubos micrófugos actúan como aislante entre la muestra contenida y el medio circundante dificultando por esta razón la transferencia de energía térmica. Asimismo, la geometría del tubo micrófugo presenta una pequeña área superficial a cualquiera de los medios utilizados para la transferencia de la energía térmica. La utilización continuada de tubos micrófugos en esta técnica, con su geometría que no es óptima, indica que las ventajas de la transferencia térmica mejorada (que se consiguen al aumentar el área superficial de un contenedor de muestras para una muestra de volumen constante) no se han reconocido hasta el momento.

Además, también se han utilizado dispositivos que utilizan baños de agua con conmutación fluidica (o transferencia mecánica) como dispositivo de ciclo térmico para la reacción de la cadena de polimerasa. Si bien se han utilizado baños de agua en el ciclo de la mezcla de reacción de la cadena de polimerasa de acuerdo con una variación deseada de temperatura con respecto al tiempo necesario para que tenga lugar la reacción, la elevada masa térmica del agua (y la baja conductividad térmica de los tubos micrófugos de plástico) ha sido un aspecto significativamente limitativo en cuanto al comportamiento del aparato y a la especificidad de la reacción.

Los dispositivos que utilizan baños de agua tienen un rendimiento limitado. La causa de ello es que la masa térmica del agua restringe significativamente el gradiente máximo de la temperatura con respecto al tiempo que se puede alcanzar. Asimismo, el aparato con baño de agua se ha observado que es muy engorroso debido a las dimensiones y número de tubos portadores de agua y dispositivos externos de control de temperatura del agua. Además, la necesidad de excesivo mantenimiento periódico e inspección de los racores para el agua a efectos de detectar fugas en aparatos con baño de agua es dificultosa y requiere mucho tiempo. Finalmente, es difícil con aparatos con baño de agua controlar la temperatura en los tubos de muestra con la exactitud que sería de desear.

La Patente U.S.A. N° 3.616.264 de Ray muestra un aparato térmico de aire forzado destinado a efectuar ciclos con aire para calentar o enfriar muestras biológicas a una temperatura constante. Si bien el dispositivo de Ray es más o menos eficaz en el mantenimiento de una temperatura constante dentro de la cámara de aire, no se adapta a la necesidad de ajustar rápidamente la temperatura de forma cíclica de acuerdo con la variación de temperatura con respecto al tiempo requerida para procesos biológicos, tales como la reacción de la cadena de polimerasa.

Las Patentes U.S.A. N° 4.420.679 de Howe y N° 4.286.456 de Sisti y otros dan a conocer estufas cromatográficas de gas. Los dispositivos que se dan a conocer en dichas patentes Howe y Sisti y otros son adecuados para llevar a cabo procedimientos de cromatografía gaseosa pero no proporcionan capacidad de realización de ciclos térmicos que sea significativamente más rápida que lo que se consigue por cualquiera de los dispositivos que se han descrito. La

realización de ciclos térmicos rápidos es útil para llevar a cabo muchos procedimientos. Dispositivos tales como los que se describen en dichas patentes Howe y Sisti y otros no son adecuados para llevar a cabo de manera rápida y eficaz las mencionadas reacciones.

La Patente U.S.A. N° 5.455.175 da a conocer un aparato para realizar ciclos térmicos en el que se utiliza un tubo capilar de paredes delgadas. Los tubos capilares no comprenden una parte en forma de embudo.

La Patente U.S.A. N° 3.219.412 da a conocer un aparato para el tratamiento químico secuencial automatizado. Los tubos capilares dados a conocer en el documento pueden comprender un embudo y están abiertos por ambos extremos del tubo capilar. El tubo capilar es utilizado en el aparato para transportar la muestra hasta el recipiente de recepción.

En particular, la reacción de la cadena de polimerasa (PCR) es una técnica de amplificación fundamental de ADN esencial en la biología molecular moderna. A pesar de su carácter útil y su popularidad, el conocimiento actual de PCR no ha avanzado mucho. Se deben optimizar las amplificaciones por pruebas sucesivas y los protocolos son seguidos frecuentemente de forma ciega. La comprensión limitada de PCR de la técnica actual es un buen ejemplo de la forma en la que los actuales técnicos en la materia se conforman en utilizar una técnica potente sin reflexión ni comprensión.

Los procesos biológicos tales como PCR requieren la realización de ciclos de temperatura con la muestra. La técnica anterior, tal como se ha explicado anteriormente, no solamente lleva a cabo los ciclos de temperatura lentamente, sino que ignora los principios que subyacen y que permiten el funcionamiento de PCR y que se podrían utilizar para hacer el PCR incluso más potente. Así por ejemplo, sería un gran progreso en esta técnica el dar a conocer métodos y aparatos particularmente adaptables para llevar a cabo rápidamente PCR y para el análisis de la reacción que está teniendo lugar, especialmente si dicha reacción es analizada mientras está teniendo lugar, es decir, en tiempo real.

Breve resumen y objetivos de la invención

Teniendo en cuenta el estado de la técnica anteriormente descrita, la presente invención está destinada a conseguir los siguientes objetivos.

Es un objetivo de la presente invención dar a conocer un aparato para controlar de manera precisa la temperatura de muestras biológicas.

Es otro objetivo de la presente invención dar a conocer un aparato con el que se pueda someter a muestras biológicas a ciclos térmicos rápidos utilizando aire como medio de transferencia térmica.

Es un objetivo de la presente invención dar a conocer un sistema y un método para llevar a cabo de forma rápida PCR rápidamente y para supervisar simultáneamente la reacción.

Es otro objetivo de la presente invención dar a conocer un sistema y método para llevar a cabo PCR de forma rápida y supervisar simultáneamente la reacción mientras está teniendo lugar.

Otro objetivo de la presente invención es dar a conocer un sistema y método para llevar a cabo PCR de forma rápida mientras también se ajustan los parámetros de reacción mientras está teniendo lugar la reacción.

Éstos y otros objetivos y ventajas de la invención quedarán más evidentes en la descripción y reivindicaciones siguientes, o se podrán captar por la práctica de la invención.

De acuerdo con un aspecto de la invención se prevé un aparato que está particularmente adecuado para someter muestras biológicas a ciclos térmicos rápidos a efectos de llevar a cabo uno o varios procesos o procedimientos.

La invención da a conocer:

un recipiente de plástico/cristal para contener una muestra de fluido biológico mientras se lleva a cabo la amplificación del ácido nucleico, comprendiendo dicho recipiente un material ópticamente claro, configurado para contener un máximo de 1 ml de muestra, comprendiendo además:

a) una parte en forma de tubo capilar que está cerrada en un extremo,

b) una parte de recipiente (450C) estando la parte en forma de embudo unida al extremo abierto de la parte en forma de tubo capilar; y

c) una estructura para sellar la parte en forma de tubo capilar

en la que la parte en forma de tubo capilar está fabricada de plástico.

Otro aspecto de la presente invención da a conocer:

una serie de recipientes de plástico/cristal como se definen en la reivindicación 5.

5 La invención también da a conocer:

el uso de un recipiente de plástico/cristal, según la presente invención, para PCR en Tiempo Real caracterizado porque dicho recipiente está destinado a contener una muestra de fluido biológico mientras se lleva a cabo la ampli-
10 ficación del ácido nucleico, comprendiendo dicho recipiente un material ópticamente transparente, configurado para contener como máximo 1 ml de una muestra, según la reivindicación 8.

Según otro aspecto, la presente invención da a conocer métodos y aparatos para la supervisión continua de la amplificación de ADN, así como realizar el seguimiento del avance de dichos procedimientos. En particular, da a
15 conocer métodos y aparatos para la supervisión continua de la fluorescencia del procedimiento de reacción en cadena de la polimerasa, preferiblemente componentes ópticos combinados con estructuras para proporcionar unos ciclos rápidos de temperatura a efectos de controlar continuamente la amplificación de ADN por una serie de diferentes técnicas de fluorescencia. Los contenedores de muestras de cristal capilar permiten una rápida transferencia de calor desde el medio de transferencia térmica preferente (permitiendo 30 ciclos de amplificación en menos de 15 minutos cuando un gas tal como aire es utilizado como medio de transferencia térmica) y supervisando simultáneamente la
20 reacción.

Se utilizan técnicas ópticas para controlar el avance de la reacción mientras se produce la misma. En algunas realizaciones preferentes de la invención, se añaden sondas fluorescentes a la mezcla de reacción. Entonces, la presente invención supervisa la fluorescencia, como mínimo, una vez durante una transición de temperatura, y preferentemente
25 la fluorescencia es captada dos o más veces durante una transición de temperatura, desde una muestra única o desde múltiples muestras. Se incluye un carrusel rotativo para desplazar secuencialmente las muestras, una a una, a un lugar de supervisión o control, siendo sometidas la totalidad de las muestras simultáneamente a ciclos térmicos rápidos. De modo deseable, realizaciones de la presente invención prevén la supervisión de la fluorescencia una vez por ciclo de amplificación o supervisión de la temperatura, tiempo y fluorescencia de modo continuo en la totalidad de cada ciclo de amplificación.
30

Utilizando la presente invención, se puede obtener un gráfico tridimensional de temperatura, tiempo y fluorescencia. Los gráficos de fluorescencia con respecto a la temperatura de las sondas de hibridación discriminan entre la señal acumulativa, irreversible, de fraccionamiento de exonucleasa y la hibridación reversible, dependiente de la
35 temperatura, de las sondas adyacentes. Las sondas de hibridación son más útiles que las sondas de hidrólisis porque la dependencia de temperatura de la fluorescencia se puede seguir y utilizar para detectar alteraciones en secuencia del producto, es decir, polimorfismos y mutaciones. Utilizando colorantes que muestran fluorescencia en presencia de DNA de doble hilera, se pueden seguir dentro de cada ciclo la desnaturalización del producto, la reasociación y extensión. La presente invención da a conocer un aparato y métodos para llevar a cabo de manera rápida las reacciones
40 de amplificación de ADN que combinan amplificación y análisis de la reacción en menos de quince minutos, y más preferentemente en menos de quince minutos, y de modo más preferente en menos de diez minutos.

Breve descripción de las figuras

45 Para apreciar mejor la forma en la que se obtienen los objetivos y ventajas de la invención que se han indicado y otros, se realizará una descripción más específica de la invención que se ha descrito brevemente en lo anterior haciendo referencia a los dibujos adjuntos. Teniendo en cuenta que estos dibujos no se deben considerar como limitativos de su alcance, la invención se describirá y se explicará con especificidad adicional y detalle mediante la utilización de los dibujos adjuntos en los que

50 La figura 1 muestra una vista en perspectiva de un aparato de ciclos térmicos adaptado para realizar ciclos térmicos con muestras biológicas y adaptado especialmente para su utilización en la amplificación de ADN con los recipientes de la presente invención.

55 La figura 2 es una vista lateral en alzado de la parte de la cámara de fluido del aparato de la figura 1.

La figura 3 es una vista en planta interior de la cámara de fluido del aparato mostrado en la figura 1.

60 La figura 4 muestra una vista en planta interior de otra cámara de fluido de otra realización de la presente invención.

La figura 5 muestra la curva optimizada de la temperatura con respecto al tiempo para una reacción de cadena de polimerasa utilizando el dispositivo de ciclos térmicos de la presente invención.

65 La figura 6 muestra gráficamente el efecto de un tiempo de desnaturalización sobre los rendimientos de la reacción de cadena de polimerasa utilizando el dispositivo de ciclos térmicos de la presente invención.

La figura 7 muestra gráficamente el efecto del tiempo de reasociación en la especificidad de la reacción de cadena de polimerasa y rendimientos utilizando el dispositivo de ciclos térmicos.

ES 2 304 573 T3

Las figuras 8A-B, son vistas en sección transversal en perspectiva y en alzado, respectivamente, de otra realización preferente del uso de la presente invención.

La figura 8C es una representación esquemática de la relación del elemento productor de calor y los tubos capilares que mantienen las muestras biológicas 10 en el ejemplo comparativo mostrado en las figuras 8A-B.

La figura 9A es un ejemplo comparativo y muestra los resultados de cuatro perfiles de temperatura/tiempo distintos (A-D) y sus productos de amplificación resultantes después de treinta ciclos (A-D).

La figura 9B es un ejemplo comparativo y muestra un ciclo de otro perfil preferente de temperatura/tiempo. Las figuras 9C-G muestran ciclos a título de ejemplo de otros perfiles preferentes de temperatura/tiempo.

La figura 10 se refiere a un diagrama de bloques de un circuito de control de la pendiente de temperatura según la presente invención.

La figura 10A es una representación gráfica del efecto de la velocidad de transición de temperatura desde la temperatura de desnaturalización del producto a la temperatura de reasociación del cebador sobre la especificidad del producto de la reacción.

La figura 11 es una vista esquemática de un aparato de ciclos térmicos rápidos preferente, con detección de fluorescencia.

La figura 11A es un diagrama de temperatura con respecto al tiempo que muestra un funcionamiento preferente del aparato de la figura 11.

La figura 12 es una representación de gráficos tridimensionales de temperatura, tiempo y fluorescencia durante la amplificación de un fragmento de ADN de hepatitis B en presencia de SYBR Green I.

Las figuras 12A-C son representaciones de gráficos bidimensionales de temperatura con respecto al tiempo, fluorescencia con respecto al tiempo y fluorescencia con respecto a la temperatura que se han mostrado en conjunto en forma de gráfico tridimensional en la figura 12.

La figura 13 es un gráfico de fluorescencia con respecto a temperatura durante la amplificación de un fragmento de 536 pares de bases del gen humano β -globina en presencia de SYBR Green I.

La figura 14 es un gráfico de la fluorescencia con respecto al número de ciclos obtenido.

La figura 14A muestra la leyenda para la figura 14, y subsiguientes figuras, indicando diferentes números de copias de la plantilla inicial.

La figura 15 es un gráfico de fluorescencia con respecto al número de ciclos.

La figura 16 es un gráfico de proporción de fluorescencia con respecto a temperatura.

La figura 17 es un gráfico de relación de fluorescencia con respecto a temperatura.

La figura 18A es un gráfico que representa un paradigma de PCR en equilibrio.

La figura 18B es un gráfico que representa un paradigma de PCR cinético.

La figura 18C es un gráfico que representa diferentes perfiles de tiempo/temperatura cerca de la temperatura de reasociación.

La figura 19 representa un ejemplo comparativo configurado para control continuo de una muestra.

Las figuras 19A-19D son representaciones de diferentes configuraciones de contenedores de muestras.

La figura 19E es un gráfico que muestra el efecto de las diferentes configuraciones de contenedores de muestras de las figuras 19A-D sobre la respuesta de temperatura de la propia muestra.

Las figuras 19F y 19G son vistas lateral y desde un extremo, respectivamente, de un contenedor de muestras preferente según la presente invención.

Las figuras 19H y 19I muestran, respectivamente, dos posibles orientaciones de un tubo capilar rectangular cuando se detecta la fluorescencia de la muestra.

La figura 20 muestra la disposición óptica destinada a proporcionar un control continuo de una muestra sometida a amplificación de ADN.

ES 2 304 573 T3

La figura 21 es una representación esquemática de un aparato de ciclos térmicos rápidos con detección de fluorescencia en la punta de los contenedores de muestras.

Las figuras 21A-D muestran contenedores compuestos de plástico/cristal en los que se disponen muestras biológicas.

La figura 22 muestra segmentos útiles de temperatura con respecto al tiempo para control de hibridación con fluorescencia.

La figura 22A es un gráfico que muestra la eficacia de conductos de luz por el visionado de la punta en vez de la parte lateral de un contenedor de muestras capilar.

La figura 22B muestra el rendimiento de los conductos de luz mediante dos tamaños distintos de tubos de muestras capilares.

La figura 22C es un diagrama de bloques de alto nivel mostrando las tareas que son llevadas a cabo por una realización preferente de la presente invención que comprende un dispositivo de ciclos rápidos de temperatura con detección de epifluorescencia.

La figura 22D es un gráfico de la temperatura con respecto al tiempo para reacción PCR en la que se utiliza realimentación de fluorescencia para controlar los parámetros de la reacción.

La figura 22E es un gráfico de la fluorescencia con respecto al tiempo para una reacción PCR en la que se utiliza realimentación de fluorescencia para controlar los parámetros de la reacción.

La figura 23 es un gráfico de la fluorescencia con respecto al tiempo que muestra la relación inversa entre la temperatura y la fluorescencia.

La figura 24 es un gráfico de la temperatura con respecto al tiempo que muestra la relación inversa entre temperatura y fluorescencia.

La figura 25 es un gráfico de fluorescencia con respecto a temperatura para tres productos PCR distintos en presencia de SYBR Green 1 conseguido durante una transición de temperatura de 0,2 grados por segundo a través de las temperaturas de fusión del producto.

La figura 26 es un gráfico de fluorescencia con respecto al tiempo que muestra la reasociación del producto para diferentes concentraciones de producto PCR en presencia de SYBR Green I.

Las figuras 27A y 27B son esquemas en sección de la realización mostrada en la figura 28 en modalidad de trabajo y modalidad de carga, respectivamente.

La figura 28 es una representación esquemática de un dispositivo de ciclos de temperatura de tipo rápido con detección de fluorescencia en la punta de los contenedores de muestras y que incluye el posicionado para detección de fluorescencia en dos dimensiones para optimizar la detección.

La figura 29 es una vista en perspectiva del exterior de la realización mostrada en la representación esquemática de la figura 28.

Las figuras 30A-30V son diagramas esquemáticos detallados de los componentes eléctricos.

Las figuras 31A y 31B son vistas en perspectiva y en sección transversal, respectivamente, de un sistema de manipulación de muestras.

La figura 32 es una representación esquemática de otra realización que recibe múltiples bandejas de manipulación de muestras.

Descripción detallada de las realizaciones preferentes

A continuación, se hará referencia al dibujo en el que iguales partes recibirán las mismas designaciones de referencia.

Tal como se ha mostrado en la figura 1, un dispositivo (10) de ciclos térmicos preferente comprende una cámara de fluido en bucle cerrado (preferentemente aire), indicada de manera general con el numeral (11), que está adaptada para aceptar muestras que deben someterse a ciclos a través de una puerta de comunicación (14). La cámara (11) de fluido en circuito cerrado comprende una serie de compartimientos cada uno de los cuales se describirá brevemente. El dispositivo (10) incluye también un controlador (12) que puede ser programado por medio de teclas de entrada (25) y la pantalla (26) para provocar que la cámara (11) quede sometida a ciclos en una serie de temperaturas durante un período de tiempo predeterminado. Los ciclos térmicos aplicados a la cámara (11) pueden ser utilizados para llevar

ES 2 304 573 T3

a cabo numerosos procesos y son especialmente adecuados para ampliaciones del ADN específico del cebador a partir de muestras que contienen mezclas de reacción, tal como se explicará más adelante.

La cámara (11) de fluido en circuito cerrado está comprendida en una configuración en forma general de caja por el cuerpo envolvente (13). Unos paneles (16) de montaje del ventilador, en caso deseado, pueden quedar situados a efectos de separar una sección rectangular más pequeña de la cámara (11), funcionando para soportar y fijar un cuerpo de forma general cilíndrica (15) inferior a aquél. De manera alternativa, el ventilador del dispositivo soplante (28) puede quedar alojado integralmente dentro del cuerpo envolvente (13) de la cámara.

El interior del cuerpo envolvente (15) del dispositivo soplante contiene las paletas y eje del dispositivo. El motor del dispositivo soplante (no mostrado) está situado exteriormente del cuerpo envolvente (15) del dispositivo soplante, y por lo tanto por el exterior de la cámara cerrada (11). Con esta configuración, las paletas y eje son las únicas piezas del dispositivo soplante que quedan expuestas a la circulación de fluido caliente dentro de la cámara (11). Sería desventajoso montar el motor dentro de la cámara que sometería al motor a variaciones de temperatura y que aumentaría también la masa térmica del motor a la que está sujeta a calentamiento y enfriamiento. La reducción de la masa térmica expuesta al fluido en la cámara (11) es deseable con respecto al rendimiento global del dispositivo (10) en su función de someter las muestras situadas en su interior a un desarrollo deseado de la temperatura con respecto al tiempo, utilizando perfiles predeterminados o alterando uno o varios parámetros de la reacción al continuar la reacción, tal como se explicará de manera más completa más adelante.

El dispositivo soplante (28) es un dispositivo soplante de tipo bien conocido identificado como del tipo “en línea” que utiliza preferentemente un ventilador del tipo hélice, debido a su masa térmica general baja, o en caso deseado, un ventilador del tipo de jaula de ardilla, poseyendo el ventilador preferentemente una capacidad mínima de 75 pies cúbicos por minuto.

La plataforma (17) del solenoide lleva fijado un solenoide (18). La armadura (19) del solenoide está fijada al extremo superior (21) de la varilla (20) que está fijada rígidamente a la puerta de evacuación (14) y fijada con capacidad de rotación al cuerpo envolvente (13) en puntos situados por encima y por debajo de dicha puerta (14). La varilla (20) permite, por lo tanto, que dicha puerta de evacuación (14) gire libremente con respecto al cuerpo envolvente (13) alrededor del eje longitudinal de la varilla.

Un resorte (22) está fijado en uno de sus extremos al cuerpo envolvente (13) por el pie de soporte (23). El extremo opuesto del resorte (22) está fijado al extremo superior (21) de la varilla (20) directamente adyacente al acoplamiento de la armadura (19) del solenoide. El resorte (22) está dispuesto entre estos dos puntos de fijación de manera que quede tensado. El resorte (22) tiende, por lo tanto, a tirar del extremo superior (21) hacia el pie de soporte (23), que a su vez tiende a hacer girar la puerta de evacuación (14) hacia su posición de cierre. Cuando se ha accionado el solenoide (18), la armadura (19) tiende a tirar del extremo superior (21) de la varilla (20) en la dirección del solenoide (18), lo cual es la dirección opuesta de tracción del resorte (22), y que tiende a abrir la puerta de evacuación (14).

El controlador, indicado de manera general con un numeral (12), está unido eléctricamente a la cámara (11) por medio del cable de transmisión (24). El cable (24) suministra potencia asimismo al motor del dispositivo soplante (no mostrado) y a la bobina de calentamiento (31). Además, el controlador (12) está también conectado al sensor (35) del termopar para recibir señales correspondientes a datos de temperatura y al solenoide (18) para activar la armadura del solenoide.

El controlador (12) puede consistir en cualquier tipo bien conocido de unidad de control de temperatura programable para controlar la bobina de calentamiento (31), puerta de evacuación (14) y dispositivo soplante a efectos de conseguir determinadas temperaturas como función del tiempo dentro de la cámara (11), y que también es capaz de ser programado para accionar una salida de relevador para activar un solenoide en períodos de tiempo predeterminados y determinados niveles de temperatura de la cámara. Un controlador preferente de temperatura (12) a utilizar en la realización de las figuras 1-3 es un controlador de temperatura de tipo proporcional Partlow MIC-6000, que se puede conseguir de la firma Omega Engineering Inc, de Stanford, Connecticut, como controlador de proceso modelo N° CNB600.

Tal como se ha mostrado en las figuras 2 y 3, el interior de la cámara (11) está dividido en cuatro compartimientos principales. El compartimiento del dispositivo soplante (28) está formado por el cuerpo envolvente (15) del dispositivo soplante y de las placas (16) para el montaje de dicho dispositivo soplante. La totalidad del compartimiento (28) del dispositivo soplante está llenada con el ventilador y partes del eje de un dispositivo soplante, tal como se ha descrito anteriormente. El dispositivo soplante puede ser correspondiente a cualquier tipo de diseños conocidos, tal como se ha descrito anteriormente, y se ha omitido por lo tanto, de la figura 3 a efectos de mayor claridad. Es suficiente, a efectos de la presente invención, comprender que el ventilador situado en el compartimiento soplante (28) hace pasar fluido hacia dentro del compartimiento (28) del dispositivo soplante a través de la abertura de entrada (36) y empuja al fluido hacia afuera de la abertura de salida (37).

Es preferible que el fluido sea impulsado por el dispositivo soplante con un caudal mínimo de 75 pies cúbicos por minuto. No obstante, es importante, a efectos de la presente invención, observar que el fluido situado en la cámara (11) establece contacto solamente con el ventilador y una parte del eje de impulsión del dispositivo soplante, estando situado el motor del dispositivo soplante fuera del cuerpo envolvente (15) de dicho dispositivo soplante a efectos de

ES 2 304 573 T3

evitar cualquier contacto del mismo con el fluido de la cámara (11). Esta consideración contribuye a que la velocidad de funcionamiento de la presente invención haga mínimo el material que establece contacto con el fluido dentro de la cámara (11) a efectos de minimizar la masa térmica de material que se debe calentar y/o enfriar durante el proceso de ciclos. Al hacer mínima la masa térmica que se debe calentar o enfriar por el fluido, el tiempo de respuesta necesario para llevar el contenido de la cámara (11) a una temperatura uniforme disminuye de modo notable.

El fluido que sale del compartimiento (28) del dispositivo soplante a través de la abertura de salida (37) se introduce en el compartimiento de calentamiento (29). El fluido que pasa hacia adentro del compartimiento de calentamiento (29) debe pasar por las bobinas de calentamiento (31). Si las bobinas de calentamiento (31) se calientan más que el fluido que pasa hacia el compartimiento de calentamiento (29), el fluido se calentará al ser obligado a pasar por dicho compartimiento. La bobina de calentamiento es preferentemente una bobina de conductor nicrom de 1000 vatios (125 voltios en CA) arrollado alrededor de un microsoporte. No obstante, se podría utilizar cualquier unidad de calentamiento adecuada para el calentamiento del tipo de fluido presente en la cámara. La realización específica de bobina de calentamiento mostrada en las figuras 1-3 está fabricada por Johnstone Supply, de Portland, Oregon.

La bobina de calentamiento es activada por un relevador de salida incluido en el controlador (12). El relevador preferente es un relevador de estado sólido de 125 voltios en CA, 25 A, fabricado por Omega Engineering Inc. de Stanford, Connecticut, como modelo N° Omega SSR 240 D25.

El fluido que pasa por el compartimiento de calentamiento (29) choca sobre los deflectores (32) y (33) antes de pasar al compartimiento de reacción (30). Los deflectores (32) y (33) tienden a interrumpir el flujo de fluido laminar y generan turbulencia para mezclar de manera efectiva el fluido de manera que éste llega al compartimiento de reacción (30) a una temperatura homogénea.

El detector del termopar (35) proporciona una señal de entrada eléctrica al controlador (12) que corresponde a la temperatura del fluido en el compartimiento de reacción (30). El control de la temperatura durante el funcionamiento del dispositivo (10) de ciclos térmicos se consigue preferentemente mediante un termopar de tipo "J" de hierro-constantan de capacidad 30. El controlador utiliza esta información para regular la bobina de calentamiento (31) de acuerdo con los perfiles de temperatura con respecto al tiempo programados y para activar el solenoide (18), tal como se explicará en su momento.

El fluido que pasa por el compartimiento de reacción (30) al compartimiento de retorno de aire (34) debe pasar a través del compartimiento de muestra (27) (tal como se han mostrado en líneas de trazos). El compartimiento de muestra (27) se explicará también en su momento.

El fluido del compartimiento de retorno (34) ha sido enfriado ligeramente debido a la transferencia de calor del mismo a las muestras situadas en el compartimiento de muestras (27). El fluido que retorna al compartimiento (34) es llevado a través de la abertura de entrada (36) hacia adentro del compartimiento (28) del soplante donde es obligado nuevamente, por acción del ventilador, a salir por la abertura de salida (37) pasando al compartimiento de calentamiento (39). De este modo, la cámara de fluido (11), cuando funciona con la puerta de salida (14) cerrada, es una cámara de fluido en circuito cerrado que hace recircular de manera continuada el fluido según una trayectoria de bucle cerrado por cada uno de sus compartimientos a efectos de llevar su contenido a una temperatura uniforme. La circulación continua del aire en la cámara (11) permite que las muestras del compartimiento de muestras (27) sean llevadas a una temperatura predeterminada lo más rápidamente posible, y que luego queden mantenidas a dicha temperatura, en caso deseado.

Cuando el dispositivo (10) debe ser utilizado no solamente para calentar material situado en el compartimiento de reacción (27), sino también para enfriar a continuación estos materiales lo más rápidamente posible a una temperatura igual o superior a la temperatura del fluido ambiente (aire), el controlador (12) puede ser programado para activar el solenoide (18) para provocar que la puerta (14) se abra, permitiendo que grandes cantidades de fluido ambiente barran de forma inmediata el compartimiento (11) mientras que el fluido caliente de su interior escapa simultáneamente.

La desactivación de la bobina de calentamiento (31) mientras continúa la activación del dispositivo soplante con la puerta (14) abierta, impulsará el fluido ambiente hacia adentro del compartimiento de retorno (34) y desde allí al compartimiento (26) del dispositivo soplante. El dispositivo soplante empujará a continuación este fluido ambiente a través del compartimiento de calentamiento (29) donde pasará directamente al compartimiento de reacción (30) sin ser calentado por la bobina (31). El fluido ambiente pasa a continuación a través del compartimiento de muestras (27) y escapa hacia afuera de la cámara (11) a través de la puerta (14). Debido a la masa térmica mínima del material situado en la cámara (11) y a la acción del ventilador de un dispositivo soplante, grandes cantidades de fluido ambiente serán forzadas a pasar por el compartimiento de muestras (27), y desde allí hacia afuera de la cámara (11). De este modo, se obtiene una refrigeración rápida de las muestras o del material situado en el compartimiento de reacción (27).

El compartimiento de muestras (27) está dimensionado a efectos de permitir que una serie de muestras, tal como los tubos de cristal alargados y huecos que contienen una muestra en su interior, queden fácilmente situadas en una orientación separada de manera que el fluido pueda ser distribuido de manera regular alrededor de cada muestra. En caso deseado, el compartimiento de muestras (27) puede ser dimensionado y configurado a efectos de permitir la inserción de estantes, cestas o similares que han sido configurados a efectos de aceptar una serie de muestras en disposición de separación uniforme entre sí, a efectos de simplificar la carga de las muestras en la cámara de muestras (27).

El acceso al compartimiento de muestras (27) se consigue por rotación de la puerta (14) a su posición abierta. Una vez que la puerta (14) se ha hecho girar aproximadamente 90 grados desde su posición cerrada, el compartimiento de muestras (27) es fácilmente accesible a través de la misma. Asimismo, tal como se puede apreciar en las figuras 1-3, la rotación de la puerta de evacuación (14) en 90 grados aproximadamente desde su posición cerrada provoca que el compartimiento (34) de retorno de fluido quede substancialmente cerrado con respecto al compartimiento de reacción (30). De este modo, cuando el dispositivo (10) se encuentre en modalidad de “refrigeración”, el fluido ambiente entra directamente en el compartimiento de retorno de fluido (34) y es obligado a través del compartimiento (28) del dispositivo soplate, compartimiento de calentamiento (29), compartimiento de reacción (30), y compartimiento de muestras (27) substancialmente a lo largo de la misma trayectoria que la trayectoria de flujo de fluido en circuito cerrado que se ha descrito anteriormente. El fluido es obligado a continuación hacia afuera de la cámara de aire (11) y se ve impedido de retroceder hacia adentro del compartimiento de retorno de aire (34) por el posicionado de la puerta de evacuación (14) entre el compartimiento de muestras (27) y el compartimiento (34) de retorno de fluido.

Por lo tanto, la puerta de evacuación (14) no solamente permite que el fluido ambiente entre en la cámara (11), sino que también puede impedir que el fluido recircule en forma de bucle a través de la cámara (11). En vez de ello, el fluido es obligado a pasar a través del compartimiento de muestras (27) y a continuación hacia afuera de la cámara (11) para ayudar en la refrigeración rápida del contenido de las muestras y de la cámara (11).

Cuando el dispositivo (10) es utilizado para amplificación cíclica de ADN, se requiere un efecto cíclico repetitivo por las diferentes temperaturas. Las muestras que contienen una mezcla de reacción para la reacción de cadena de polimerasa, deben ser sometidas a ciclos aproximadamente 30 veces pasando por los cambios de temperatura que corresponden a la desnaturalización, reasociación y alargamiento del proceso de amplificación.

El dispositivo (10) debido a sus nuevas características que se han descrito, es capaz de someter muestras a ciclos con periodos significativamente más cortos en comparación con lo conocido en la técnica anterior. Por ejemplo, la aplicación de amplificación de ADN representada en las figuras puede pasar por un perfil de ciclos de temperatura con respecto al tiempo en 30-60 segundos (ver figura 5). Este mismo ciclo utilizando dispositivos de la técnica anterior requeriría aproximadamente 5-10 veces más tiempo. Estos bajos tiempos de ciclo se han demostrado también que incrementan el rendimiento y especificidad de la reacción de cadena de polimerasa con respecto a los ciclos conocidos en la técnica anterior.

Ejemplo 1

La reacción de cadena de polimerasa fue realizada en un volumen de 10 μ l con 50 ng de plantilla genómica humana DNAes, 0,5 mM de cada desoxinucleótido, 500 nM de cada uno de dos cebadores oligonucleótidos G(ITT GOCCAATCTACTCCCAGO (SEQ ID NO: 5) y GCTCACTCAGTCTSGCAAAG (SEQ ID NO: 6) en un tampón de reacción consistente en 50 mM Tris-HCl <pH 8,5 de 25°C), 3,0 mM de cloruro magnésico, 20 mM KCl y 500 μ g/ml de albúmina de suero bovino. Se añadió polimerasa de ADN “*Thermus aquaticus*” (0,4 μ), las muestras se colocaron en tubos capilares de paredes delgadas de 8 cm de longitud, (fabricados por Kimble, Kimax 46485-1), y los extremos fueron fundidos con un quemador de gas de laboratorio de manera que se encontraba una burbuja de aire en ambos extremos de cada tubo.

Los tubos capilares fueron colocados a continuación prácticamente en un soporte construido por un “panel perforado prepunzonado” de 1 mm de espesor (fabricado por Radio Shack). La mezcla fue sometida a ciclos 30 veces pasando por desnaturalización (90-92°C), reasociación (50-55°C) y alargamiento (72-75°C) consiguiendo el perfil de temperatura con respecto al tiempo de una figura 5. Se realizó el control de temperatura de los tubos capilares con un termopar miniatura (IT-23, Sensortek, Clifton, NJ) colocado en 10 μ l de agua desionizada y conectado a un monitor termopar (BAT-12, Sensortek). Se fraccionaron los productos de amplificación por electroforesis sobre 1,5% de gel de agarosa. Se obtuvieron productos de amplificación específica con un buen rendimiento.

Debido al hecho de que el dispositivo (10) utiliza aire como medio de transferencia térmica en vez de agua, tiene la ventaja de que la transferencia de calor tiene lugar a través de un medio de baja capacidad calorífica (aire) que se puede calentar muy rápidamente.

El tiempo de respuesta para la refrigeración de las muestras es muy rápido debido a la utilización de tubos capilares de cristal de paredes delgadas para contener las muestras en vez de tubos microfugos de plástico tal como se ha realizado con anterioridad en los procesos de la técnica anterior, y minimizando la masa térmica del material situada en el interior de la cámara (11) (ver figura 5). Estos tiempos de respuesta pueden permitir la optimización de las exigencias de tiempo y temperatura para las fases de desnaturalización, reasociación y alargamiento en la reacción de cadena de polimerasa.

Además, se obtienen tiempos reducidos de “rampa”, es decir, el tiempo necesario para llevar la temperatura de la muestra desde un nivel de temperatura a nivel de temperatura siguiente que corresponde a fases del proceso de amplificación se acorta. Esto disminuye el tiempo requerido para una amplificación completa y permite asimismo, un estudio específico de la reasociación, desnaturalización y cinética de la encima con un protocolo de reacción de cadena de polimerasa.

ES 2 304 573 T3

Los deflectores (32) y (33) (tal como se muestra en la figura 3) se pueden utilizar en caso deseado para conseguir mejor homogeneidad de temperatura dentro del compartimiento de muestra (27). Tal como se ha mostrado, los deflectores (32) y (33) disminuyen la variación de temperatura en el compartimiento de reacción (30) de unos 10°C a unos 2°C. En caso deseado, otros deflectores (o deflectores más complicados) pueden ser utilizados para disminuir adicionalmente la variación de temperatura en el compartimiento de reacción (30). De modo alternativo, tal como se ha mostrado en la figura 4, el ventilador puede quedar dispuesto más abajo con respecto a la bobina de calentamiento (31), pero antes del compartimiento de muestras (27) para conseguir una mezcla más uniforme.

Los productos de amplificación obtenidos por la utilización del aparato (10) son, como mínimo, cuantitativa y cualitativamente tan deseables como los obtenidos por el método manual de ciclos de baño de agua. No obstante, son posibles ventajas en la especificidad y en el rendimiento con un control térmico rápido de la mezcla de reacción.

La figura 6 muestra el efecto de la temperatura con respecto al tiempo según el gráfico de la figura 5 utilizado con el aparato de ciclos térmicos (10) en cuanto a especificidad (es decir, rendimiento en un producto específico en oposición a una serie de productos similares o "sombra"). Tal como se puede apreciar, cuanto más corta es la rampa y el tiempo de reasociación, mayor es la especificidad del producto. La respuesta rápida de temperatura del aparato (10) permite mejor especificidad y rendimiento, lo cual no es posible con sistemas de la técnica anterior.

La figura 7 muestra el efecto de variación del tiempo de desnaturalización de la temperatura con respecto al tiempo en el gráfico de la figura 5 utilizado con el aparato de ciclos térmicos (10) de la presente invención en los rendimientos de la amplificación de ADN. Cada una de las líneas verticales más brillantes corresponden a un tiempo y temperatura de desnaturalización específicos. Tal como se puede observar, el rendimiento es mayor para el tiempo de desnaturalización más corto posible. Este resultado no es posible con los sistemas de la técnica anterior.

Tal como está demostrado, al disminuir la capacidad térmica (masa térmica) del aparato (10), ello puede disminuir notablemente el tiempo total requerido para llevar a cabo la reacción de cadena de polimerasa. Además, la utilización de pequeños volúmenes de muestra acorta adicionalmente el tiempo total requerido para la reacción y también reduce las cantidades de reactivos de elevado precio que se deben utilizar hasta 90% aproximadamente, reduciendo de este modo adicionalmente el coste de llevar a cabo los procedimientos. Por ejemplo, en el ejemplo comparativo representado en las figuras 1-3, se pueden utilizar de modo deseable tubos capilares (108) que tienen diámetros internos comprendidos en una gama de unos 0,25 mm hasta 1,0 mm. En algunas aplicaciones, los tubos capilares (108) que tienen diámetros internos en una gama de unos 0,02 mm hasta 0,1 mm pueden ser también utilizados.

El aparato (10) es útil para amplificar ADN de cualquier fuente de procedencia. Si bien se han explicado configuraciones y disposiciones específicas de la invención en relación con realizaciones específicas del dispositivo de ciclos térmicos (10), también se pueden utilizar otras disposiciones y configuraciones. Por ejemplo, se pueden utilizar, de manera alternativa, en el dispositivo (10), varios fluidos distintos del aire, con una masa térmica generalmente baja.

Otra realización se ha representado en las figuras 8A-C. La figura 8A es una vista en perspectiva y la figura 8B es una vista en alzado y sección mostrando la realización adicional. Se comprenderá que muchos de los componentes anteriormente explicados también se pueden aplicar en el ejemplo mostrado en las figuras 8A-C. De este modo, solamente la información adicional pertinente referente a este ejemplo se explicará a continuación. De modo importante, en el ejemplo de las figuras 8A-C, el elemento productor de calor es adyacente a los contenedores de muestras biológicas permitiendo un calentamiento y enfriamiento más rápidos de las muestras biológicas, tal como se explica más adelante.

Tal como se apreciará brevemente, el aparato de las figuras 8A-C proporciona mejoras adicionales con respecto a la técnica anterior en lo que respecta a la velocidad a la que se pueden llevar a cabo los ciclos térmicos, por ejemplo, 15 ó 30 ciclos de amplificación ADN en 30, 15, 10 minutos, o menos. Además, el aparato (100) proporciona una mejor homogeneización térmica en el conjunto de las muestras que lo que ha resultado posible con anterioridad.

Se ha mostrado en la figura 8A la configuración general del cuerpo envolvente (102) de este ejemplo. El cuerpo envolvente (102) descansa sobre pies (104) (se aprecian mejor en la figura 8B) y funciona de manera que retiene las otras estructuras descritas en su lugar y aísla estas estructuras que se calientan por el medio ambiente circundante. Se incluyen en la característica (100) de la figura 8A las teclas de entrada (25) y una pantalla (26) igual que en el aparato anteriormente descrito (10). Las estructuras de control anteriormente descritas pueden ser fácilmente modificadas o utilizadas como modelo para un medio de control para su utilización en el ejemplo de las figuras 8A-C.

Tal como se aprecia mejor en la sección transversal de la figura 8B, una cámara de muestra está designada por el soporte (106). Una tapa (138) conectada al cuerpo envolvente (102) por una charnela (131) puede ser abierta para permitir acceso a la cámara de muestra (106). La cámara de muestra (106) es preferentemente cilíndrica pero puede tener cualquier forma o dimensiones requeridas por la aplicación específica.

La cámara de muestras (106) está preferentemente alineada con un material esponjoso (110) de color negro cuya superficie tiene características de absorción de la luz, poseyendo el grueso del material esponjoso características aislantes. El material esponjoso de color negro puede ser un material que se puede conseguir fácilmente y un material fabricado a partir de un material plástico. El material esponjoso (110) es preferentemente un material que es enfriado

ES 2 304 573 T3

fácilmente por el aire que pasa por encima del mismo, es decir, el material tiene baja conductividad térmica y una superficie porosa.

La superficie porosa de color oscuro o negro del material convierte la radiación con longitud de onda más corta que choca con la superficie en radiaciones con longitud de onda más larga, es decir, calor, que se radia a la cámara de muestra.

El material esponjoso (110) funciona aislando térmicamente la cámara de muestra con respecto al espacio de aire circundante en el cuerpo envolvente y también para convertir la luz emitida por la lámpara (112) en energía térmica. El material esponjoso (110) puede ser sustituido por otros cuerpos. Por ejemplo, un material que tiene color negro, oscuro u otra superficie no reflectante, tal como una placa delgada de policarbonato que tiene una superficie pintada de negro, puede recibir un soporte de un material aislante, tal como fibra de vidrio o un material esponjoso. La superficie de color negro u oscura, que puede ser pintada sobre una serie de sustancias distintas, convierte la radiación con longitud de onda más corta que choca sobre la misma en radiación térmica, mientras que el material aislante aísla térmicamente la cámara de muestra con respecto al medio ambiente circundante. Por esta razón, utilizando las explicaciones que se han facilitado, los técnicos en la materia podrán utilizar muchos materiales distintos y cuerpos distintos como recubrimiento para la cámara de muestra.

La lámpara (112) es preferentemente una lámpara halógena de 500 vatios. Si se utilizan dispositivos de control apropiados, se pueden utilizar lámparas de mayor potencia, o una serie de lámparas, por ejemplo, cuatro lámparas halógenas de 500 vatios. Una base de enchufe (112A) para la lámpara está fijada al cuerpo envolvente (102) por el soporte (112B). La lámpara (112) es capaz de calentar de manera rápida y uniforme la cámara de muestra (106) a la temperatura deseada. También se pueden utilizar otras fuentes de calor, por ejemplo, radiación de rayos infrarrojos, tal como el elemento conductor de nicromo descrito anteriormente, dentro del alcance de la presente invención.

Se han representado en la figura 8B dos tubos capilares de paredes delgadas (108) tales como los que se han descrito anteriormente. Si bien se han mostrado dos tubos capilares de paredes delgadas (108), la cámara de muestra (106) puede contener muchos de dichos tubos. Los tubos capilares de paredes delgadas (108) tienen varias ventajas importantes con respecto a los dispositivos anteriormente utilizados, tal como se ha descrito anteriormente y, junto con la cámara de muestras (106), funcionan como ejemplo actualmente preferente de medios para contener una muestra biológica.

Se observará que también se pueden utilizar otros muchos cuerpos o estructuras que llevan a cabo funciones similares o equivalentes. Los tubos capilares de paredes delgadas (108) se dejan preferentemente que se prolonguen parcialmente hacia afuera de la cámara de muestra a través de las aberturas (140) para mayor facilidad de acceso, pero pueden quedar completamente contenidas dentro de la cámara de muestras (106) tal como muchas otras estructuras de retención de fluidos que son apropiadas para aplicaciones específicas. Los tubos capilares de paredes delgadas preferentes (108) tienen una capacidad aproximada de 10 μl . Tal como se comprenderá, el volumen de la muestra se debe mantener reducido, y el área superficial de la estructura de soporte de la muestra relativamente grande, y conjuntamente presentan una base térmica relativamente pequeña. También es preferible que la estructura de soporte de la muestra contenga un volumen comprendido entre 1 l hasta unos 10.000 μl , pero los técnicos en la materia observarán que también se pueden utilizar otros volúmenes de muestras si se tiene en consideración la diferente masa térmica de la estructura.

La lámpara (112) y el material esponjoso aislante (110) proporcionan conjuntamente un calentamiento rápido y uniforme de la muestra contenida en los tubos capilares de paredes delgadas (108) y el aire contenido dentro de la cámara de muestra (106). Un termopar (134) queda incluido dentro de la cámara de muestra (106) para detectar la temperatura dentro de la cámara y se utiliza para mantener la temperatura deseada dentro de la cámara de muestra tal como se ha descrito anteriormente.

El termopar (134) es preferentemente un termopar de tipo disponible en la técnica cuya respuesta térmica se adapta sustancialmente a la respuesta térmica de la muestra biológica y del contenedor que la contiene. Estos termopares pueden ser obtenidos comercialmente de fuentes de suministro tales como Idaho Labs que fabrica una línea de termopares designados como termopares con funda metálica, de tipo J. La adecuación de la respuesta térmica del termopar a la de la muestra biológica y al contenedor se puede llevar a cabo preferentemente insertando un microtermopar, tal como el termopar modelo IT-23 de la firma PhysiTemp conocido en esta técnica, en una muestra biológica típica soportada por el contenedor escogido y sometiendo la muestra y el termopar objeto de pruebas a los mismos cambios de temperatura. El termopar sometido a pruebas, u otros criterios externos, pueden ser cambiados hasta que la respuesta térmica del termopar se adapta de manera adecuada a la respuesta térmica de la muestra y de su contenedor.

La disposición representada en la figura 18 proporciona calentamiento y enfriamiento más uniformes de la muestra que los dispositivos anteriormente conocidos. En dispositivos anteriormente conocidos, la transferencia de calor a la muestra es llevada a cabo por convección a través de la misma. El movimiento inducido por convección de la muestra dentro de cualquier estructura se utiliza para mantener la muestra, siendo provocado por gradientes de temperatura o diferencias de temperatura en las muestras biológicas generalmente pequeñas (por ejemplo, 10-100 μl).

El efecto de los gradientes de temperatura dentro de la muestra resulta más pronunciado y más difícil de controlar al disminuir el tiempo de ciclo para una muestra. La existencia de temperaturas irregulares dentro de una muestra, y

particularmente el basarse en “mezcla por convección” dentro de la muestra en lo que se basan los dispositivos de la técnica anterior, aumentan de manera general el tiempo de ciclo para una muestra y probablemente tienen efectos perjudiciales en la muestra biológica. El aparato (100) es capaz de proporcionar calentamiento y refrigeración de manera tal que se mantiene una diferencia térmica dentro de una muestra de 10 μ l a un valor no superior a $\pm 1^\circ\text{C}$ en todo momento durante un ciclo de 30 segundos.

A efectos de favorecer un calentamiento y enfriamiento uniformes, es preferible que los tubos capilares de paredes delgadas (108) se encuentren como mínimo uniformemente separados con respecto a la fuente de calor, por ejemplo, la lámpara (112) del aparato (100). La figura 8C proporciona una vista superior esquemática de la lámpara (112) y la serie de tubos capilares de paredes delgadas (108) dispuestos en el aparato (100) representado en las figuras 8A-B.

En la disposición mostrada en la figura 8C, los tubos capilares de paredes delgadas (108) que están más alejados de la lámpara (112) (indicado por la línea F) son preferentemente no más de 40% aproximadamente, y más preferentemente no más de 25% sustancialmente, más alejados de la lámpara (112) que la distancia existente entre dicha lámpara (112) y los tubos capilares de paredes delgadas 108 que se encuentran más próximos a la lámpara (112) (indicado por la línea N). Por ejemplo, la distancia indicada por la línea N puede ser aproximadamente de 7,3 cm mientras que la distancia indicada por la línea F puede ser de 8,5 cm aproximadamente.

Se apreciará que la disposición de los tubos capilares de paredes delgadas (108) puede ser distinta a la representada en las figuras, por ejemplo, circular o semicircular. Además, se observará que el punto desde el cual se medirá la distancia entre el elemento productor de calor y los tubos capilares variará al variar el tipo y dimensiones del elemento productor de calor. Por ejemplo, el elemento productor de calor puede comprender una serie de lámparas o de elementos de resistencia eléctrica que varían en cuanto a forma y dimensiones. En algunas realizaciones, también puede ser importante considerar la distancia con respecto a la pared de la cámara de la muestra a la que están dispuestos los contenedores. En el ejemplo mostrado, las aberturas (140) (ver figura 8A) funcionan como medios para soportar los contenedores de muestra pero también se podrían utilizar otras estructuras o cuerpos que lleven a cabo funciones equivalentes de acuerdo con la presente invención.

El aparato (100) enfría también las muestras contenidas en los tubos capilares (109) de manera muy rápida y uniforme. A efectos de enfriar la cámara de muestra (106), se introduce aire desde el exterior del cuerpo envolvente (102) hacia adentro del cuerpo envolvente pasando por una abertura inferior (114) del cuerpo envolvente por la acción de un ventilador (116) que está conectado a un eje de motor (122) impulsado por el motor (110). Dado que se desea un enfriamiento rápido de la cámara de muestra, es preferible que la combinación del motor (118) y el ventilador (116) pueda desplazar suficientes volúmenes de aires hacia adentro de la cámara de muestra (106), dispersando luego dicho aire adentro de la cámara de muestra (106), tal como se explicará en breve. Otras disposiciones del motor (118) y el ventilador (116) ilustrados en la figura 8B pueden ser utilizadas dentro del alcance de la presente invención.

La utilización de aire como medio de transferencia térmica, en contraste con otros gases y líquidos, tiene la ventaja de su precio reducido, fácil disponibilidad, facilidad de mezcla, y no crear problemas. En el caso de las realizaciones descritas, la mayor proporción de área superficial con respecto a volumen de los tubos capilares que contienen las muestras proporciona una rápida transferencia térmica utilizando aire como medio de transferencia térmica.

Durante las partes de refrigeración del ciclo térmico, la acción del ventilador (116) lleva aire a temperatura ambiente hacia adentro del cuerpo envolvente (102). Se dispone una puerta de evacuación (128), articulada en la charnela (129). La puerta de evacuación (128) se abre automáticamente por acción del solenoide (132) de manera que el interior del cuerpo envolvente (102) es aislado con respecto a la puerta (130) del cuerpo envolvente superior. En algunas realizaciones, el solenoide (132) es preferentemente substituido por un motor paso a paso, tal como es conocido en esta técnica. La utilización de un motor paso a paso permite que la puerta de evacuación (128) pueda ser abierta y cerrada de manera precisa y por incrementos de acuerdo con las necesidades de calentamiento y refrigeración de las muestras. Los técnicos en la materia serán capaces de deducir un mecanismo de control apropiado para su utilización con un motor paso a paso, por ejemplo, un controlador SC-149 para motor paso a paso (de la firma Alpha Products) tal como es conocida en esta técnica, utilizando las informaciones que se facilitan en esta descripción.

Debido a la disposición de la puerta (120) de la cámara de muestras inferior y al área en sección transversal mayor y a la posición de la puerta (126) de la cámara de muestras superior, el aire a temperatura ambiente es desplazado hacia adentro de la cámara de muestras (106) y es dispersado y mezclado dentro de la cámara de muestras (106) por una paleta (124) que está conectada al eje (122) del motor. La paleta (124) debe girar a una velocidad relativamente elevada, por ejemplo, suficientemente rápida para crear velocidades de aire de unos 250 metros por minuto, de manera más preferente 500 metros por minuto, y de modo más preferente 1.000 metros por minuto dentro de la cámara de muestra (106). Con la paleta (124), que puede ser una paleta múltiple o simple, girando a elevada velocidad, se desplaza el aire o se impulsa el aire hacia adentro de la cámara de muestra (106) y se obliga a salir al mismo de la cámara de muestra (106) siguiendo la ruta indicada por la línea de trazos (136). La rotación de la paleta (124) ayuda también a la mezcla del aire que entra en la cámara de mezcla (106) y asegura la transferencia más eficaz de energía térmica desde la superficie de los tubos capilares (100) de paredes delgadas al aire que atraviesa la cámara de muestra (106). Se observará que estructuras distintas a las mostradas pueden llevar a cabo funciones equivalentes.

ES 2 304 573 T3

Al accionar el solenoide (132) para abrir la puerta de evacuación (128), la totalidad del aire a temperatura ambiente que se desplaza hacia adentro de la cámara de muestras (106) es expulsado a través de la puerta superior (126) de la cámara de muestras y a continuación por la puerta (130) del cuerpo superior llevando el calor desde la cámara de muestras (106) a la atmósfera circundante. La rápida mezcla del aire pasante, que desemboca en la cámara de muestras

Ejemplo 2

La figura 9A muestra los resultados de cuatro perfiles distintos de temperatura/tiempo (A-D) y sus productos de amplificación resultantes después de treinta ciclos (A-D). Los perfiles A y B de la figura 9A fueron obtenidos realizando un dispositivo de bloque de calentamiento de la técnica anterior utilizando un tubo microfugo del tipo anteriormente conocido. Tal como se puede observar en la figura 9A, las transiciones entre las temperaturas son lentas y muchas bandas no específicas se encuentran presentes en los perfiles A y B. El perfil B muestra mejoras en la eliminación de algunas de las bandas no específicas (en contraste con el perfil A) limitando el tiempo en que cada muestra permanece a cada temperatura indicando, de este modo, qué tiempos más cortos producen resultados más deseables.

Los perfiles C y D fueron obtenidos utilizando el aparato de las figuras 8A-B. Tal como se puede apreciar en la figura 9A, la amplificación es específica y, de manera deseable, aunque el rendimiento es máximo en C (alargamiento de 60 segundos) es todavía completamente adecuado en D (alargamiento de 10 segundos).

Los tiempos y temperaturas óptimos para la amplificación de un fragmento de 536 bp de β -globina procedente de ADN genómico humano también se determinaron. El rendimiento de la amplificación y la especificidad del producto eran óptimos cuando la desnaturalización (93°C) y la reagrupación (55°C) eran menos de 1 segundo. No se observó ventaja alguna en tiempos más largos de desnaturalización o de reagrupación. El rendimiento aumentó con tiempos de alargamiento más largos (77°C) pero se produjeron pocos cambios con tiempos de alargamiento superiores a 10-20 segundos. Estos resultados inesperados indican que los dispositivos de los que se disponía anteriormente para amplificación de ADN no hacen máximas las condiciones necesarias para optimizar las exigencias físicas y enzimáticas de la reacción.

Se puede conseguir información de: Wittwer, Carl T., Marshall, Bruce C., Reed, Gudrun B., and Cherry, Joshua L., "Rapid cycle Allele-Specific Amplification with Cystic Fibrosis $\Delta F908$ Locus", 39 *Clinical Chemistry* 804 (1993) and Wittwer, Carl T., Reed, Gudrun H., and Rire, Kirk M., "Rapid DNA Amplification", THE POLYMERASE CHAIN REACTION 174 (1994).

Por la información conseguida en la figura 9A, se puede observar que las muestras colocadas son sometidas a ciclos térmicos rápidos de manera que la temperatura de la muestra aumente y disminuya a una velocidad preferentemente, como mínimo, de 0,5°C/segundo. En el caso de la presente invención llevando a cabo la reacción de cadena de polimerasa, el cambio de temperatura se lleva a cabo preferentemente en una gama aproximada comprendida entre 30°C y 50°C. Es preferible que los ciclos térmicos sean llevados a cabo con rapidez suficiente para terminar, como mínimo, treinta ciclos térmicos en cuarenta minutos y más preferentemente para terminar treinta ciclos térmicos en veinte minutos, y más preferentemente para terminar treinta ciclos térmicos en diez minutos.

El aparato (100) aumenta y disminuye más preferentemente la temperatura de la muestra a una velocidad como mínimo de 1,0°C/segundo e incluso de modo más preferente a una velocidad mínima de 4,0°C/segundo y de modo todavía más preferente a una velocidad mínima de 10,0°C/segundo. De manera crítica, la muestra biológica, no solamente el medio circundante y/o el contenedor de muestras, deben sufrir los cambios térmicos especificados. Los dispositivos de los que se disponía anteriormente, si bien tenían el inconveniente de no poder llevar a cabo los cambios térmicos tan rápidamente como la presente invención, tampoco reconocieron el problema de cambiar la temperatura de la muestra, no sólo la temperatura del medio circundante y del contenedor, de manera rápida y uniforme.

Haciendo referencia a continuación al gráfico de la figura 9B, el método puede conseguir de manera deseable ciclos térmicos preferentemente a una velocidad mínima de 10°C/seg., y más preferentemente a una velocidad, como mínimo, de 20°C/seg., en una gama de temperaturas superior a unos 20°C, más preferentemente en una gama de temperaturas superior a unos 30°C, y más preferentemente en una gama de temperaturas de unos 40°C. La figura 9B muestra la temperatura en °C de la muestra biológica, no solamente el aire circundante o el contenedor, al sufrir la muestra biológica unos ciclos térmicos. En la figura 9B se puede observar una muestra de PCR que se inicia a unos 74°C y que se calienta a la temperatura de desnaturalización, indicada en (D), a unos 92°C durante 2 segundos. La muestra es enfriada a continuación a una temperatura de reagrupación, indicada en (A), de unos 55°C durante dos segundos. La transición entre la temperatura de desnaturalización y la temperatura de reasociación cubre un campo de 37°C solamente en menos de 4 segundos proporcionando la velocidad, como mínimo, de 10°C/seg. A continuación, la muestra es calentada a una temperatura ampliada de 74°C durante 5 segundos, tal como se indica con la letra (E) en la figura 9B. Los ciclos de las muestras pasando por la temperatura de desnaturalización, temperatura de reasociación y la temperatura de amplificación se repiten treinta veces o las veces que sea necesario.

Las figuras 9C-G muestran ciclos a título de ejemplo de otros perfiles preferentes de temperatura/tiempo. Se comprenderá por los técnicos en la materia que se pueden alterar los perfiles que se han representado de temperatura/tiempo

ES 2 304 573 T3

para llevar a cabo procesos específicos de acuerdo con la presente invención. Los técnicos en la materia apreciarán que los métodos y dispositivos anteriormente conocidos, tales como dispositivos que conducen el calor hacia y desde la muestra a través de un sólido o un líquido, no pueden proporcionar los perfiles resultantes de temperatura/tiempo que se describen. Además, los métodos y dispositivos anteriormente conocidos no sugieren ni indican los perfiles de temperatura/tiempo descritos en esta descripción. Además, se observará que los dispositivos y métodos anteriormente conocidos que utilizan aire como medio de transferencia, por ejemplo, estufas cromatográficas, de tipo anteriormente conocido, no pueden proporcionar ni sugieren ni muestran, los perfiles de temperatura/tiempo que se describen y que son obtenidos en la práctica de la presente invención.

A efectos de conseguir el tiempo de ciclo térmico más rápido, es preferible que la lámpara (-112- en las figuras 8A y 8B) tenga una potencia nominal de 2000 vatios o que se incluya una serie de lámparas que proporcionen una potencia de salida similar. También es preferible, asimismo, incluir un circuito de control de la pendiente de temperatura que se ha representado en la figura 10 en relación con un sistema de bus-A controlador/captador utilizando un panel microcontrolador 8052 con reloj y un interpretador de programa de alto nivel que se puede conseguir de la firma Alpha Products (modelo n°. SP-127) de Darian, Connecticut. Se incluye un código de programación a título de ejemplo en relación con el microcontrolador descrito en el Código de Programación de Apéndice A que forma parte de la descripción. El código de programación que se facilita en el apéndice A es un archivo BASIC52 para descarga en serie en el microcontrolador y proporciona un control de la pendiente de temperatura a título de ejemplo durante los ciclos térmicos. La utilización del dispositivo productor de calor de 2000 vatios y las estructuras de control descritas permiten conseguir de modo deseable velocidades de ciclos térmicos de 20°C/seg.

La disposición preferente para el circuito de control de la pendiente de temperatura representado en la figura 10 se explicará con el entendimiento de que los componentes adicionales necesarios no explícitamente ilustrados en la figura 10 podrán ser previstos fácilmente por los técnicos en la materia.

El circuito de control de la pendiente de temperatura de la figura 10 comprende un termopar (200) acoplado a la respuesta de temperatura de la muestra tal como se ha explicado anteriormente. El termopar (200) está conectado al circuito integrado (206), que preferentemente es de tipo conocido con la designación AD595, cuya salida es transportada al filtro de paso bajo de 4º orden (208) con una frecuencia de corte de 100 Hz y a un convertidor (210) analógico a digital de 12 bits cuya salida es utilizada para proporcionar una pantalla digital de la temperatura.

La salida del circuito (206) es transportada también a un circuito de pendiente medida (212). El circuito de pendiente medida (212) incluye preferentemente un amplificador operativo (353) con la designación (219), un potenciómetro de 100 K Ω (214), un potenciómetro de 1 M Ω (230), y un condensador de 22 μ F. El circuito de pendiente medida (212) emite una señal a la entrada inversora de un amplificador operativo 353 designado (246).

Un circuito (222) de ajuste de la pendiente incluye un convertidor de ajuste de pendiente positiva digital a analógico (226) y un convertidor de ajuste de pendiente negativa digital a analógico (224). Los convertidores digital a analógico (224) y (226) son preferentemente convertidores digital a analógico de 8 bits a los que se hace referencia en la técnica con la designación DA167. El circuito de ajuste de pendiente puede recibir preferentemente instrucciones de otro dispositivo digital (no mostrado en la figura 10) tal como un ordenador personal. La salida del circuito de ajuste de pendiente (228) es comunicada al circuito sumador (240).

El circuito sumador (240) incluye preferentemente resistencias de 100 K (236), (238) y (244) y un amplificador operativo 353 designado con el numeral (242). La salida del circuito sumador (240) es transportada a la entrada no inversora del amplificador operativo (246) y representa la pendiente deseada del cambio de temperatura. La salida del amplificador operativo (246) es facilitada a un transistor (248) contenido dentro del circuito (262) de conmutación de potencia.

El circuito de conmutación de potencia (262) comprende un suministro de 5 VCC (250) que proporciona corriente al transistor (248). El transistor (248) tiene su emisor conectado a un circuito 3010 designado (254) mediante una resistencia (252) que es preferentemente una resistencia de 330 Ω . El circuito 3010 indicado con el numeral (254) comprende una salida conectada en serie con una resistencia (256) que es preferentemente una resistencia de 180 Ω . Un triac (258) se utiliza preferentemente para controlar la corriente suministrada a la lámpara (262), o a otro dispositivo productor de calor, desde la fuente de corriente alterna (260).

El circuito de control de la pendiente de temperatura representado en la figura 10, en cooperación con los componentes del otro sistema descrito, proporcionan ciclos térmicos de muestras biológicas que llegan a 20°C/seg en un campo de temperatura de 30°C, y más preferentemente en una gama de temperatura de 40°C, manteniéndose la homogeneidad en la totalidad de la muestra biológica.

Se apreciará que los sistemas descritos en el presente documento pueden ser utilizados fácilmente para diferentes aplicaciones, entre las que se incluyen los procesos de la reacción en cadena de la polimerasa; secuenciación cíclica, otros protocolos de amplificación, tales como la reacción en cadena de la ligasa. La presente invención da a conocer de manera ventajosa un aparato para el control preciso de la temperatura de las muestras que se encuentran en la cámara de muestras y que varía de manera rápida y precisa la temperatura de las muestras que se encuentran en la cámara según un perfil predeterminado de temperatura contra tiempo.

Tal como se ha indicado anteriormente, y en contraste con las indicaciones de la técnica anterior, la reacción de cadena de polimerasa se puede llevar a cabo con rapidez. Utilizando los métodos y aparatos descritos, se puede completar de manera rutinaria el número necesario de ciclos de temperatura en mucho menos tiempo que lo que es posible con los dispositivos de la técnica conocida, por ejemplo, en menos de 15 minutos. Al hacer mínimos los tiempos de desnaturalización y de reasociación, se mejoran también la especificidad y rendimiento de amplificaciones de ciclos rápidos en una medida que no había sido posible hasta el momento. Además, aparte de facilitar una transferencia de calor rápida, la utilización de contenedores de muestras ópticamente transparentes, tales como tubos capilares transparentes, permite el control continuo de fluorescencia de la amplificación de ADN de acuerdo con la presente invención.

La figura 10A muestra gráficamente el efecto de las velocidades de transición de temperatura sobre la especificidad de la reacción PCR y rendimiento utilizando un aparato comparativo. Los resultados de la figura 10A fueron obtenidos utilizando un fragmento de 536 pares de bases del gen de betaglobina que fue amplificado a partir de 50 ng de ADN genómico humano con 50 mM Tris, pH 8,3, 2 mM MgCl₂, 50 µg/ml de albúmina de suero bovino, 0,5 µM de cada cebador, 0,2 mM de cada dNTP, y 0,4 U de polimerasa de Taq DNA nativa en una reacción de 10 µl. Los cebadores de betaglobina humana RS42 y KM29 (536 pares de bases) se describen en C.T. Wittwer, G.C. Fillmore y D.R. Hillyard, "Automated Polymerase Chain Reaction in Capillary Tubes with Hot Air," ("reacción de cadena de polimerasa automatizada en tubos capilares con aire caliente"), *Nucl. Acids. Res.* 17:4353-4357. Los parámetros de ciclos de temperatura eran de 94°C para 0 seg., 55°C para 0 seg., y 72°C para 10 seg. Se llevaron a cabo 35 ciclos de amplificación con las velocidades indicadas entre todas las temperaturas. Las muestras fueron sometidas a electroforesis sobre geles de agarosa 1,5% y se efectuó su tinte con 0,5 µg/ml de bromuro de etidio. La especificidad y el rendimiento disminuyen al disminuir la velocidad de transición de la temperatura.

Las probetas fluorescentes pueden ser utilizadas para detectar y controlar la amplificación de ADN. Tal como es conocido por los técnicos en la materia, las sondas útiles incluyen colorantes específicos para ADN de doble hilera y sondas específicas de secuencia. Con el bromuro de etidio intercalador, la fluorescencia roja excitada por UV aumenta después de la amplificación. Si bien se han utilizado tubos microfugos como contenedores de muestras para amplificación de ADN, los métodos y aparatos que se describen utilizan ventajosamente contenedores de muestras con muchas de las características de estructuras a las que se hace referencia como tubos capilares.

La utilización de los contenedores de muestra descritos permite la detección de fluorescencia mientras la muestra es mantenida dentro del contenedor, tal como se explicará más adelante de manera más completa. Los técnicos en la materia apreciarán el número de diferentes esquemas de detección de fluorescencia de la amplificación de ADN que se encuentran actualmente a disposición. Por ejemplo, es posible fácilmente la detección de fluorescencia específica de secuencia utilizando la presente invención y sondas de hibridación de oligonucleótidos. Según otro ejemplo, se pueden fragmentar sondas de fluoresceína/rodamina con doble marcado durante la extensión de polimerasa mediante actividad de 5'-exonucleasa, separando los fluoróforos e incrementando la proporción de fluorescencia fluoresceína/rodamina.

Utilizando las realizaciones de la presente invención que se describirán a continuación, la fluorescencia puede ser medida después de haber completado los ciclos de temperatura, una vez por ciclo como control de acumulación de producto, dos o más veces durante una transición de temperatura, o de manera continua dentro de cada ciclo. Como contraste con la presente invención, los métodos anteriormente conocidos muestran ciclos relativamente lentos y no indican la captación y análisis de la fluorescencia durante los cambios de temperatura.

La presente invención permite el control ciclo a ciclo para la cuantificación del número de copias de la plantilla inicial. Para llevar a cabo este control ciclo a ciclo se capta la fluorescencia durante la fase de ampliación o fase combinada de reasociación/extensión de cada ciclo y relativa a la concentración de producto. Por ejemplo, se conoce un ensayo cuantitativo para ARN de hepatitis C utilizando el intercalador YO-PRO-1TM y se puede utilizar de acuerdo con la presente invención. Para más información consultar el trabajo de Ishiguro, T., J. Saitch, H. Yawata, H. Yamagishi, S. Iwasaki, y Y. Mitoma, 1995, "Homogeneous quantitative assay of hepatitis C virus RNA by polymerase chain reaction in the presence of a fluorescent intercalater," ("ensayo cuantitativo homogéneo de ARN de virus de hepatitis C por reacción de cadena de polimerasa en presencia de un intercalador fluorescente") *Anal. Biochem.* 229:207-213. Antes de la presente invención, no se había intentado el control continuo de la fluorescencia dentro de cada ciclo durante las transiciones de temperatura.

Se da a conocer una realización de un aparato de ciclos de temperatura de tipo rápido integrado con óptica fluorescente de dos colores para conseguir una supervisión continua de la fluorescencia. Tal como se explicará más adelante de forma más completa, se dan a conocer técnicas de fluorescencia preferentes para controlar la amplificación de ADN como ejemplos específicos de llevar a cabo este aspecto.

Los técnicos en la materia estarán familiarizados con la utilización de bromuro de etidio en técnicas de fluorescencia. En un ejemplo que se describe a continuación, es preferible que se utilice como colorante específico de doble hilera SYBR[®] Green I, bien conocido en esta técnica y que se puede conseguir de la firma Molecular Probes de Eugene, Oregon.

En un ejemplo, se captan cada 200 mseg el tiempo, temperatura y fluorescencia durante la reacción de amplificación. Al captar datos regularmente durante la reacción, la captación de dichos datos revela detalles finos de la desnaturalización, reasociación y extensión del producto que no se disponen en los aparatos y métodos anteriormente disponibles.

ES 2 304 573 T3

Tal como se apreciará por los técnicos en la materia, el control de una vez por ciclo de múltiples muestras sometidas a amplificación de ADN es una poderosa herramienta cuantitativa. De modo importante, tal como se apreciará a través de la presente descripción, la supervisión continua dentro del ciclo puede identificar la naturaleza de la fluorescencia de la sonda, puede proporcionar conocimiento de la mecánica de la amplificación de ADN que no se conocían anteriormente en esta técnica, y puede evaluar el producto de PCR y las curvas de fusión de la sonda para identificar los productos de amplificación y las mutaciones.

Haciendo referencia a continuación a la figura 11, se facilita una vista esquemática de un dispositivo de ciclos preferente de temperatura con detección de fluorescencia, que se ha indicado de modo general con el numeral (300). Se dispone preferentemente una fuente de aire caliente forzado (302). La fuente de aire caliente forzado (302) es preferentemente un dispositivo comercial que comprende una bobina de calentamiento de 1600 vatios y un ventilador. Una fuente de aire de enfriamiento (304) con aire forzado es asimismo preferible. La fuente de aire frío forzado (304) es preferentemente un dispositivo soplante de polos protegidos de 2200 rpm que se puede conseguir de la firma Dayton de Niles, Illinois, modelo n°. 4C006B. Es preferible que la fuente de aire frío (304) proporcione aire a la temperatura ambiente, pero se encuentra dentro del ámbito de la presente invención utilizar un medio para proporcionar fluido que se encuentra a una temperatura más baja que la temperatura del aire ambiente.

En la realización de la figura 11, los conductos (306) y (308) conectan la fuente de aire caliente forzado (302) y la fuente de aire frío forzado (304), respectivamente, a una cámara de muestras (310). Los conductos (306) y (308) consisten preferentemente en tubos de nylon negro ondulado que tienen un diámetro de 2,5 cm. El conducto (306) está conectado a la cámara de muestras (310) con intermedio de una abertura (306A) y el conducto (308) está conectado a la cámara de muestra (310) con intermedio del conducto (308A). Una abertura de ventilación (312) y un ventilador extractor (314) funcionan extrayendo aire de la cámara de muestras (310). Además, un dispositivo de protección del interior de la cámara de muestras (310) contra la luz ambiente forma parte de la cámara de muestras (310).

La temperatura de las muestras dentro de la cámara de muestras (310) es supervisada preferentemente por un termopar tubular, con funda metálica (316), de la firma Idaho Technology de Idaho Falls, Idaho, modelo n° 1844, que es acoplado en respuesta térmica a las muestras retenidas en los tubos capilares. De forma importante, la homogeneidad de la temperatura ambiente de la cámara de muestras (310) es conseguida por mezcla del aire dentro de la cámara de muestra (310). Es preferible que esta mezcla del aire dentro de la cámara de muestras (310) sea llevada a cabo mediante el ventilador central de la cámara de muestras (318). El ventilador de la cámara de muestras comprende preferentemente un ventilador de paletas de 1,7 X 11 cm de la firma Idaho Technology, modelo n° 1862, y un motor de la firma Idaho Technology, modelo n° 1861, que crea velocidades de aire, como mínimo, de 800 a 1000 metros por minuto dentro de la cámara de muestras (310). Estas rápidas velocidades del aire pueden no ser necesarias en todas las aplicaciones de la presente invención, pero dichas velocidades rápidas del aire ayudan en una mezcla a fondo y a la homogeneidad de la temperatura dentro de la cámara de muestras (310).

Dentro de la cámara de muestras (310), una serie de muestras son mantenidas en tubos capilares, algunas de las cuales se han indicado con el numeral (320), y están situadas en una orientación vertical sobre un carrusel rotativo (322). El carrusel (322) tiene preferentemente catorce centímetros de diámetro y es obligado a girar mediante un motor paso a paso (324) de 400 pasos por revolución, controlado por un módulo de control paso a paso (326). El motor paso a paso (324) es preferentemente un motor de la firma New England Affiliated Technologies de Lawrence, Massachusetts, modelo n° 2198364, y el módulo de control micro paso a paso (326) es un módulo de control micro paso a paso New England Affiliated Technologies, modelo n° MDM7, que facilita 22.800 pasos por rotación del carrusel (322).

Haciendo referencia adicionalmente a la figura 11, se dispone una fuente de excitación de fluorescencia (328). Una disposición preferente para la trayectoria de excitación se describirá a continuación con una disposición preferente para la ruta de recogida de acuerdo con la presente invención que se describirá a continuación. La fuente de excitación de fluorescencia (328) incluye preferentemente una fuente de arco de xenón de 75 vatios (328A) enfocado con un reflector elíptico (328B). La fuente de arco de xenón (328A) es la que se puede adquirir preferentemente de la firma Photon Technology International de South Brunswick, Nueva Jersey, modelo n° A1010, con reflector elíptico f/2,5 (328B). El suministro de potencia y otros componentes necesarios para hacer funcionar la fuente de excitación de fluorescencia (328) son bien conocidos por los técnicos en la materia. De manera alternativa, se puede utilizar un diodo emisor de luz como fuente de excitación de fluorescencia. Los técnicos en la materia apreciarán que se pueden utilizar muchas fuentes de excitación distintas dentro del ámbito de la presente invención.

La radiación emitida por la fuente de excitación de fluorescencia (328), es enfocada aproximadamente unos 2 mm utilizando un iris ajustable (334) tal como el disponible en la industria de la firma Rolyn (Covina, California), modelo n° 75.0125. La luz emitida desde la fuente de excitación de fluorescencia (328) choca sobre el espejo frío (330), que es disponible preferentemente de la firma Rolyn, modelo n° 60.4400, y pasa a través del cristal de absorción de calor (332), que es preferentemente de la firma Rolyn, modelo n° 65.3130. Después de colimación a través de lentes planoconvexas (336), preferentemente una lente de la firma Rolyn, modelo n° 10.0260, se dispone de un filtro de interferencia (338), con paso de banda 450-490 nm, de la firma Omega Optical de Brattleboro, Vermont, modelo n° 470RDF40, una lente planoconvexa de enfoque (340), preferentemente de la firma Rolyn, modelo n° 10.0260, y una ventana de sílice (342) de 1 mm, preferentemente de la firma Omega, para impedir condensación sobre los componentes ópticos que se han descrito durante los ciclos de temperatura. Utilizando la ruta de excitación descrita, se ilumina una sección de 5-7 mm de un tubo de muestra capilar (320A).

ES 2 304 573 T3

Haciendo referencia asimismo a la figura 11, la ruta de recogida para captar la fluorescencia emitida desde la muestra (320A) se describirá a continuación. El sistema óptico de la ruta de recogida incluye la ventana (344) de sílice de 1 mm que está colocada en la ruta óptica para impedir la condensación sobre los otros componentes ópticos. Dos lentes esféricas opuestas (346A&B) preferentemente de la firma Rolyn, modelo nº 17.1175, funcionan para enfocar la fluorescencia emitida sobre una ranura (348) de 2 X 10 mm. La ranura (348) puede ser realizada preferentemente por corte de una película sometida a rayos X y la ranura (348) funciona como filtro espacial. Después de la ranura (348) (que actúa como filtro espacial), la fluorescencia emitida es impuesta a un diafragma electrónico de 35 mm (350) que funciona con intermedio de un control de diafragma electrónico (352). El diafragma electrónico de 35 mm (350) es preferentemente un modelo de diafragma Uniblitz nº VS35 y el control electrónico de diafragma (352) es preferentemente el modelo de controlador nº D122, de la firma Vincent Associates de Rochester, Nueva York. Una lente esférica de colimación (354), preferentemente de la firma Rolyn, modelo nº 17.1175, se dispone asimismo en el sistema.

Un filtro (356) queda también incluido cuando se desea detección de emisiones SYBR® Green I. El filtro (356) es preferentemente un filtro de paso de banda de 520-580 nm, de la firma Omega como modelo nº 550RDF60, que se utiliza preferentemente para captación de longitudes de onda únicas. Para detección de otras emisiones, por ejemplo, se puede utilizar una combinación de filtro dicróico (358) y filtros (358A) y (358B) de longitud de onda. Por ejemplo, para separación de las emisiones de fluoresceína y rodamina, el filtro dicróico (358) consiste preferentemente en un filtro dicróico de 560 nm, preferentemente de la firma Omega, modelo nº 560 DRLP, y un filtro de paso de banda de 520-550 nm (-358A-), preferentemente de la firma Omega, modelo nº 535DF30, para detección de la fluoresceína, y un filtro de paso de banda de 580-620 nm (-358B-), preferentemente de la firma Omega, modelo nº 600DF40, para detección de la rodamina. Para separación de las emisiones de fluoresceína y Cy5, el filtro dicróico (358) es preferentemente un filtro dicróico de 590 nm de la firma Omega, modelo nº 590 DRLP, y los filtros (358A&B) consisten preferentemente en un filtro de paso de banda 520-550 nm (-358A-), de la firma Omega, modelo nº 535DF30, para detección de fluoresceína y un filtro de paso de banda de 660-690 nm (-358B-), de la firma Omega, modelo nº 670DF20, para detección de Cy5. Los técnicos en la materia observarán fácilmente que la utilización de otros componentes se puede incrementar fácilmente utilizando la información indicada a efectos de adaptarse a otras longitudes de onda fluorescentes.

Con referencia a la figura 11, después de someter al filtro respectivo (358A) o (358B), la fluorescencia emitida es enfocada a través de dos lentes planoconvexas (360A) y (360B), cada una de ellas preferentemente de la firma Edmund de Barrington, Nueva Jersey, modelo nº 32970, y sobre tubos fotomultiplicadores (362A) y (362B), respectivamente. Los tubos fotomultiplicadores ("PMT") (362A) y (362B) se pueden adquirir preferentemente de la firma Hamamatsu de Middlesex, Nueva Jersey, modelo nº R928, y se encuentran encerrados cada uno de ellos en un cuerpo envolvente adecuado incluyendo circuitos apropiados, preferentemente de la firma Photon Technology International, modelo nº 714, con capacidades de captación analógica. Se dispone también preferentemente un módulo (364) de control de captación de datos y PMT. También se disponen diafragmas PMT manuales (366A) y (366B), tal como es conocido en esta técnica.

Los componentes ópticos que se han descrito son preferentemente de cinco centímetros de diámetro y están montados en montajes de lentes universales de cinco centímetros, tales como los de la firma Rolyn, modelo nº 90.0190. Tal como se puede realizar por los técnicos en la materia, muchos de los componentes estructurales necesarios han sido mecanizados a partir de Delrin™ negro utilizando técnicas conocidas en la industria.

Los técnicos en la materia apreciarán que el dispositivo de ciclos rápidos de temperatura con detección de fluorescencia (300) pueda ser construido de manera ventajosa utilizando diodos de emisión de luz (LED) y fotodiodos en lugar de componentes que funcionan de manera similar, representados en la figura 11. De este modo, la función de la fuente de excitación de fluorescencia (328) se puede llevar a cabo mediante diodos de emisión de luz. Los tubos fotomultiplicadores (369A&B) pueden ser también substituidos por fotodiodos. Se proporcionará más adelante en esta descripción información adicional con respecto a diodos de emisión de luz y fotodiodos. Se observará que la sensibilidad técnica está limitada por fluorescencia de fondo, la mayor parte de la cual procede de las sondas, no del sistema de detección. De manera significativa, la estabilidad es en general más importante que la sensibilidad absoluta.

Los técnicos en la materia apreciarán que el dispositivo rápido de ciclos de temperatura con detección de fluorescencia (300) representado en la figura 11 comprende las características ventajosas de un fluorímetro con control de temperatura rápida, combinación que no se ha dado a conocer ni se ha sugerido en la técnica actual. Se puede llevar a cabo PCR y se puede analizar durante un tiempo de diez a veinte minutos de ciclos de temperatura. La combinación de la presente invención de 1) supervisión de fluorescencia dentro de cada ciclo de temperatura y 2) análisis de la temperatura y dependencia del tiempo de la hibridización proporciona ventajas que no se pueden conseguir de otro modo.

Es posible utilizar métodos de fluorescencia de color único para controlar la pureza del producto y cuantificar la matriz durante PCR. Se añaden colorantes que controlan el estado de las hebras de ADN a las reacciones PCR para observación durante los ciclos de temperatura utilizando realizaciones de la presente invención.

A efectos de explicar algunas de las ventajas que se consiguen con la presente invención, se facilitarán a continuación ejemplos específicos utilizando el aparato representado en la figura 11. La amplificación de ADN fue llevada a cabo en 50 mM Tris, pH 8,3 (25°C), 3 mM MgCl₂, 500 µg/ml de albúmina de suero bovino, 0,5 µM de cada cebador, 0,2 mM de cada trifosfato deoxinucleósido y 0,2 U de Taq polimerasa por muestra de 5 µl, si no se dice lo contrario,

en los ejemplos siguientes. Asimismo en los ejemplos siguientes, se utilizó como molde de ADN, ADN genómico humano (desnatrizado 1 min por ebullición) o producto de amplificación purificada. El producto de amplificación purificada fue obtenido por extracción de fenol/cloroformo y precipitación en etanol (ver D.M. Wallace 1987, "Large-and small-scale phenol extractions and precipitation of nucleic acids" ("Extracciones de fenol en gran y pequeña escala y precipitación de ácidos nucleicos") (tal como se describe en las páginas 33-48, en S.L. Berger y A.R. Kimmel (Eds.), "Guide to Molecular Cloning Techniques" ("Guía para las técnicas de clonado molecular") (Methods in Enzymology, Vol. 152) Academic Press, Orlando), seguido de la eliminación de cebadores por lavado repetido mediante un concentrador Centricon 30 micro (de la firma Amicon de Danvers, Massachusetts). Las concentraciones de la matriz fueron determinadas por absorbancia a 260 nm. Las relaciones A260/A280 de las matrices fueron superiores a 1,7.

En estos ejemplos, se sintetizaron cebadores por química estándar fosforamidita, tal como es conocido en esta técnica, es decir, utilizando Pharmacia Biotech Gene Assembler Plus (Piscataway, Nueva Jersey). El fragmento de 180 pares de bases del gen del antígeno de superficie de hepatitis B fue amplificado utilizando cebadores 5'-CGTGGTG GACTTCTCAAT-3' (SEQ ID NO:1), y 5'-AGAAGATGAGGCATAGCGC-3' (SEQ ID NO:2) (secuencia Genbank HVHEPB). Se obtuvo el colorante SYBR® Green I de la firma Molecular Probes (Eugene, Oregon). Los cebadores de β -actina y la sonda dual de fluoresceína/rodamina fueron obtenidos de la firma Perkin Elmer (Foster City, California) (no. N808-0230). Los cebadores de β -globina humanos RS42/KM29 (536 pares de bases) y PC03/PC04 (110 pares de bases) se describen en C.T. Wittwer, G.C. Fillmore y D.R. Hillyard, "Automated Polymerase Chain Reaction in Capillary Tubes with Hot Air" ("Reacción de cadena de polimerasa automatizada en tubos capilares con aire caliente"), *Nucl. Acids. Res.* 17:4353-4357, que se incorpora como referencia. Las sondas de etiquetado único:

5' -CAAACACACACCATGCACCTGACTCCTGAGGA-fluoresceína-3' (SEQ ID NO:3)

y

5' -Cy5-AAGTCTGCCGTTACTGCCCTGTGGGCAAG-fosfato-3' (SEQ ID NO:4)

fueron sintetizados utilizando fosforamidita de fluoresceína (de la firma Glen Research of Sterling, Virginia, no. 10-1963), una fosforamidita Cy5TM (de la firma Pharmacia no. 27-1002-02), y un agente de fosforilación química (de la firma Glen Research no. 10-1900). Estas sondas adyacentes hibridizan internamente con respecto al par cebador de β -globina PC03/PC04 de la misma hebra de ADN y están separadas por un par de bases. Las sondas fueron purificadas por cromatografía líquida de alta presión C-18 de fase inversa y la homogeneidad fue comprobada por electroforesis de poliacrilamida y absorbancia (A260 y la absorbancia máxima del fluoróforo). Se utilizaron sondas de hibridación (β -actina y β -globina) en 0,2 μ m en cada caso.

En los ejemplos pertinentes que se han descrito, se cargaron en tubos de muestras capilares muestras de amplificación de 5 μ l, algunas de las cuales se han representado en la figura 11 con el numeral (320). Los tubos de muestras capilares preferentes son los de la firma Idaho Technology, modelo no. 1705, con dimensiones de 1,02 mm de diámetro externo y 0,56 mm de diámetro interno. Una vez cargados, los tubos de muestras capilares fueron sellados con llama de butano. La superficie del tubo de muestra capilar fue limpiada con metanol de calidad óptica antes de su carga en el carrusel (322) del dispositivo de ciclos rápidos de temperatura con detección de fluorescencia (300).

El control de los componentes representados en la figura 11 fue conseguido por utilización de un lenguaje de programación gráfica conocido como LabView (de la firma National Instruments, Austin, Texas) y una tarjeta multifunción de 12 bits entrada/salida (368A) (de la firma National Instruments con la designación AT-MIO-22) en un ordenador PC compatible (368) utilizando un microprocesador Intel® 80486 funcionando a una velocidad de reloj de 120 MHz. Se utilizaron canales de salida analógicos en la tarjeta de entrada/salida (368A) para controlar la sensibilidad, es decir, el voltaje PMT, de cada uno de los tubos fotomultiplicadores (362A&B). Canales de entrada analógicos en la tarjeta de entrada/salida (368A) reciben las señales de cada uno de los tubos fotomultiplicadores (362A&B). El ordenador PC compatible (369), a través de la tarjeta de entrada/salida (368A), controla la posición, velocidad y dirección de movimiento del carrusel (322). Por ejemplo, cuando se cargan tubos de muestra capilares múltiples, el carrusel (322) posiciona con rapidez cada uno de los tubos de muestras capilares (320) secuencialmente en una localización de control (localización representada por el tubo de muestras capilar -320A-) para un período de captación de 10-100 mseg. Para la supervisión continua de un único tubo de muestras capilar, el tubo de muestras capilar es mantenido en la posición de supervisión mientras se captan datos preferentemente cada 200 mseg. y se hace el promedio de acuerdo con técnicas bien conocidas. El tiempo, temperatura, y preferentemente dos canales de fluorescencia se muestran de manera continuada a través del monitor (368B) asociado con el ordenador (366) en forma de gráficos de fluorescencia con respecto a número de ciclos y fluorescencia con respecto a temperatura.

El carrusel (322) debe ser posicionado donde se captan al máximo la fluorescencia y las señales. Cuando se supervisa un único tubo de muestras capilar, tal como el tubo de muestras capilar (320A), las señales son captadas cada 200 mseg. con una constante de tiempo de integración ajustada en el tubo fotomultiplicador (362A) o (362B) o ambos, en 50 mseg. Para múltiples tubos de muestras, la constante de tiempos se ajusta en 0,5 mseg. y el carrusel es obligado a girar una vez para localizar la posición precisa en la que cada tubo de muestra capilar (320) proporciona la fluorescencia máxima en cada uno de los dos canales. Después del posicionado del tubo de muestras capilar (320A) en una localización en la que se obtiene la fluorescencia máxima, la sensibilidad de cada uno de los PMT (362A&B) es ajustada y el carrusel es obligado a girar nuevamente para contar y localizar las posiciones de todos los tubos de muestras capilares (320) del carrusel (322). Cuando se desea solamente una captación de señal de fluorescencia una vez cada

ciclo de amplificación durante la extensión, cada tubo de muestras capilar (320) es posicionado de forma secuencial en el carrusel (322) en la posición de supervisión para 100 mseg. La captación continua para tubos múltiples puede ser obtenida también por rotación continua del carrusel (322). La programación de control de temperatura se basó en un dispositivo de ciclos rápidos de temperatura de tipo comercial, con modificaciones, de la firma Idaho Technology con la marca Rapidcycler® utilizando un compilador cruzado 8051 de la firma Systronics, Salt Lake City, Utah, designado BCI51 y un sistema de Dallas development (también disponible de Systronics con la designación D882).

En la práctica, la respuesta de temperatura del dispositivo de ciclos de temperatura rápidos con detección de fluorescencia (300) es similar a la respuesta obtenida con el aparato que se da a conocer en las figuras 8A&B, permitiendo ciclos de 20-30 segundos (30 ciclos en 10-15 min) tal como se ha representado en el gráfico de la temperatura con respecto al tiempo de la figura 11A (que muestra unos ciclos de un perfil de temperatura preferente). Cuando se encuentra presente durante la amplificación un colorante fluorescente específico de doble hebra, la fluorescencia incrementa de modo general al preparar mayor cantidad de producto de doble hebra. Ver R. Higuchi, G. Dollinger, P.S. Walsh, y R. Griffith, 1992, "Simultaneous Amplification and Detection of Specific DNA Sequences," ("Amplificación y detección simultáneas de secuencias ADN específicas") *Bio/Technology* 10:413-417.

Además, también se observará que se pueden utilizar como indicadores genéricos de amplificación colorantes específicos de doble hilera tales como bromuro de etidio o SYBR® Green I. El colorante SYBR® Green I es preferente con respecto al bromuro de etidio en muchas aplicaciones porque tiene un máximo de excitación cerca de la fluorescencia y proporciona frecuentemente una señal más fuerte con ADN que la excitación visible del bromuro de etidio.

La fluorescencia depende también de la temperatura, un efecto de confusión durante los ciclos de temperatura que se elimina usualmente considerando la fluorescencia una vez por ciclo a una temperatura de extensión constante. No obstante, si se captan la temperatura, tiempo y fluorescencia cada 200 mseg durante amplificación de ciclo rápido, se observa una espiral tridimensional en el monitor (360B) tal como se ha representado en la figura 12. El gráfico tridimensional representado en la figura 12 es proyectado también en la figura 12A como gráfico bidimensional de la temperatura con respecto al tiempo, proyectado en la figura 12B como gráfico bidimensional de fluorescencia con respecto al tiempo, y proyectado en la figura 12C como fluorescencia con respecto a temperatura. La proyección de temperatura con respecto al tiempo de la figura 12A repite cada ciclo y proporciona esencialmente la misma información que se ha indicado en la figura 11A. Dado que la fluorescencia varía inversamente con la temperatura, la proyección de fluorescencia con respecto al tiempo mostrada en la figura 12B para ciclos previos es una imagen simétrica a escala del gráfico de temperatura con respecto al tiempo. Al acumularse el producto, la fluorescencia incrementa todas las temperaturas en las que se encuentra presente el producto de doble hebra. No obstante, en las temperaturas de desnaturalización, la fluorescencia vuelve a la línea base, puesto que solamente se encuentra presente ADN de hebra única.

La proyección de fluorescencia con respecto a temperatura de los colorantes de doble hebra mostrados en las figuras 12C elimina el eje de tiempo y muestra la dependencia de la temperatura de la situación de las hebras durante la amplificación de ADN. La proyección de fluorescencia con respecto a temperatura mostrada en la figura 12C es para un fragmento de 180 pares de bases de ADN del virus de hepatitis B.

Otra proyección de fluorescencia con respecto a la temperatura es la mostrada en la figura 13. La proyección representada en la figura 13 es para un fragmento de 536 pares de bases de β -globina de ADN humano. Los ciclos previos representados en la figura 13 tienen aspecto idéntico, con un incremento no lineal de la fluorescencia a bajas temperaturas. Al proceder la amplificación, los ciclos posteriores aparecen como bucles levantados entre las temperaturas de reasociación y desnaturalización que muestran una histéresis significativa. Es decir, la fluorescencia observada durante el calentamiento es mayor que durante el enfriamiento. Al calentar la muestra, la fluorescencia es elevada hasta que tiene lugar la desnaturalización (visible como caída brusca de la fluorescencia). Tal como se puede apreciar en la figura 13, al enfriarse la muestra desde las temperaturas de desnaturalización a reasociación, la señal de doble hebra aumenta con rapidez. Asimismo, tal como se puede apreciar en la figura 13, la fluorescencia continúa incrementando durante la extensión mientras la temperatura se mantiene constante.

También se pueden utilizar colorantes específicos de doble hilera de acuerdo con varios aspectos de la presente invención. La situación de hileras de los productos PCR puede ser seguida con colorantes que tiene fluorescencia en presencia de dsDNA. Cuando se encuentra presente SYBR® Green I durante la amplificación, la fluorescencia aumenta al aumentar el dsDNA. No obstante, los ciclos de temperatura introducen un efecto de confusión porque la fluorescencia es inversamente proporcional a la temperatura, tal como se ha mostrado en las figuras 26A y 26B. Al acumularse el producto, la fluorescencia aumenta excepto en las temperaturas de desnaturalización, en las que la fluorescencia vuelve a la línea base tal como se ha mostrado en la figura 12C.

Cuando se controlan muestras múltiples, utilizando el dispositivo de ciclos de temperatura rápidos con detección de fluorescencia (300), una vez cada ciclo con SYBR® Green I, se puede discriminar una gama de concentración de la matriz inicial de 107-108 tal como se ha representado en la figura 14. La figura 14A muestra la leyenda de los indicadores dispuestos en los diferentes gráficos de la figura 14, y figuras subsiguientes para diferente número de copias de la matriz inicial. Cuando los datos se normalizan como porcentaje máximo de fluorescencia de cada tubo de muestras capilar (320), se puede separar un centenar de copias iniciales de manera clara a partir de diez copias. No obstante, la diferencia entre una y diez copias es marginal, y no se observa diferencia entre cero y un promedio de copias por tubo de muestras capilar (320).

Los colorantes de doble hebra dependen de la especificidad inherente de los cebadores de amplificación. Tal como se apreciará por los técnicos en la materia, la amplificación no específica para elevados números de ciclos puede limitar la sensibilidad de detección aproximadamente a cien copias iniciales de la matriz (ver figura 14). Con los ciclos rápidos que se explican en esta descripción, se obtienen otras mejoras adicionales en la especificidad de la amplificación, mejorando de manera adicional el comportamiento de la amplificación general de ADN.

La cuantificación con sondas específicas de secuencia tiene una gama dinámica similar que los colorantes de ADN de doble hilera pero, tal como se ha mostrado en los gráficos de las figuras 15A y 15B, parecen discriminar incluso una copia única inicial de la matriz a partir de controles negativos.

Cuando se requieren detección y cuantificación de bajo número de copias, se consigue especificidad adicional por sondas fluorescentes que requieren hibridación para generación de señales. El fraccionamiento de una sonda de exonucleasa de doble etiquetado es una técnica capaz de distinguir una copia de matriz única de un control negativo tal como se ha mostrado en la figura 15. La figura 15 muestra gráficos de la proporción de fluorescencia con respecto al número de ciclos para un diferente número de copias de la matriz inicial distinto, de acuerdo con las leyendas dispuestas en la figura 14A.

La generación de señal con sondas de 5'-exonucleasa depende no solamente de la síntesis de ADN, sino que requiere hibridación e hidrólisis entre los fluoróforos de la sonda de doble etiquetado. Esta hidrólisis reduce el apagado y la proporción de fluorescencia de la fluoresceína con respecto a los incrementos de emisión de rodamina. Para más información sobre esta técnica, ver L.G. Lee, C.R. Connell y W.Bloch, 1993, "Allelic Discrimination by Nick-translation PCR with Fluorogenic Probes", ("Discriminación alélica por PCR con Nick-traducción con sondas fluorogénicas") *Nucl. Acids Res.* 21:3761-3766 & Livak, K.J., S.J.A. Flood, J. Marmaro, W. Giusti y K. Deetz, 1995, "Oligonucleotides with Fluorescent Dyes at Opposite Ends Provide a Quenched Probe System Useful for Detecting PCR Product and Nucleic Acid Hybridization", ("Oligonucleótidos con tintas fluorescentes en extremos opuestos proporcionan un sistema de sonda apagada útil para detectar producto de PCR e hibridación de ácido nucleico") *PCR Meth. Appl.* 4:351-362.

La figura 25 muestra resultados de PCR de fluorescencia a partir de una sonda con cinco bases involucradas entre etiquetas de fluorescencia y rodamina. La amplificación de cuarenta y cinco ciclos fue completada en 20 minutos utilizando el dispositivo de ciclos rápidos de temperatura con detección de fluorescencia (300) de la figura 11. Controlando la proporción de fluorescencia una vez por ciclo, se puede distinguir una gama de 109 veces la concentración de la matriz inicial. Las curvas de amplificación se desplazan aproximadamente 3-4 ciclos para cada cambio de 10 veces en concentración de matriz inicial.

Si bien la señal de fluorescencia final disminuye cuando se amplifican números bajos de copias (presumiblemente a causa de la disminución del rendimiento de la amplificación), la cuantificación entre cero y cien copias es fácilmente posible. La señal generada por sondas de exonucleasa es acumulativa y solamente relacionada de forma indirecta a la concentración de producto. Por lo tanto, la señal de fluorescencia continúa aumentando incluso después de que la cantidad de producto ha alcanzado un valor estable o plataforma. Utilizando la información contenida en esta descripción, los técnicos en la materia pueden formular normas apropiadas para controlar el rendimiento de la amplificación y fraccionamiento a efectos de llevar a cabo una cuantificación absoluta.

Los gráficos de fluorescencia con respecto a temperatura de las sondas de 5'-exonucleasa confirman que la hidrólisis de la sonda es el mecanismo de generación de señal. En la figura 16, se ha mostrado un gráfico de fluorescencia con respecto a temperatura de dos ciclos de temperatura con una sonda de exonucleasa de β -actina. En cada ciclo la proporción de fluorescencia varía linealmente con la temperatura y existe poca, o ninguna, histéresis. La señal aumenta a cada ciclo durante la fase de reasociación/extensión cuando tiene lugar la hidrólisis de la sonda. Si bien la fluorescencia de la fluoresceína y la rodamina disminuye al aumentar la temperatura (no se muestran datos en las figuras), la proporción de cambio es superior para la rodamina, con el resultado de una proporción creciente al aumentar la temperatura. No se observan efectos de hibridación dependientes de la temperatura con la sonda de 5'-exonucleasa.

Como contraste, cuando la señal de fluorescencia depende solamente de la hibridación, los gráficos de la proporción de fluorescencia con respecto a la temperatura muestran un modelo distinto, durante la histéresis un ciclo de dos temperaturas, tal como se ha mostrado en la figura 17. Los gráficos de la figura 17 representan los resultados obtenidos utilizando dos sondas adyacentes de hibridación que se encuentran presentes, una en la parte de arriba etiquetada 3' con fluoresceína y una sonda de la parte de abajo etiquetada 5' con Cy5TM. Las sondas están separadas por un intersticio de 1 par de bases. Durante la fase de reasociación/extensión de la reacción, las sondas hibridizan teniendo como resultado acumulación de producto y el incremento de la proporción de Cy5TM con respecto a la fluorescencia de fluoresceína. Durante el calentamiento a temperaturas de desnaturalización del producto, las sondas se disocian entre 65°C y 75°C, volviendo la proporción de fluorescencia a los niveles de fondo. El cambio en la proporción de fluorescencia durante la hibridación es debido, principalmente, al incremento de fluorescencia Cy5TM a partir de la transferencia de energía con resonancia. La dependencia de la hibridación con respecto a la temperatura puede ser utilizada para detectar mutaciones por desplazamiento en la curva de fusión. También son muy útiles las sondas de hibridación adyacentes para cuantificación, tal como se ha mostrado en la figura 15B.

De la explicación anterior, se observará que la supervisión de la fluorescencia durante la amplificación de ADN es una técnica analítica extraordinariamente potente. Utilizando el dispositivo de ciclos rápidos de temperatura con detección de fluorescencia (300), se pueden conseguir un control en tiempo real eficaz y con productividad en cuanto a costes, detección específica de secuencia, y cuantificación en un tiempo de cinco a veinte minutos, dependiendo del número de copias presentes de la matriz inicial.

Además, el sistema y resultado presentados en las figuras 11-17 son especialmente adecuados para el control continuo de reacción biológica utilizando colorantes fluorescentes. Por ejemplo, con control preciso de temperatura y colorantes específicos de doble hilera, se puede estimar la pureza de producto por las curvas de fusión. Con un control rápido de temperatura, según la presente invención, se puede determinar la concentración absoluta del producto por cinética de reasociación. La presente invención proporciona de manera ventajosa cambios rápidos de temperatura y homogeneidad estricta de la temperatura interna de la muestra que no se puede conseguir en la técnica anterior. Como contraste con respecto a la técnica anterior, la presente invención utiliza contenedores de muestras con una elevada proporción de área superficial con respecto al volumen (por ejemplo, utilizando los tubos capilares preferentes para muestras -320- de la figura 11) y utiliza el aire como medio de transferencia térmica proporcionando un control rápido de la temperatura de la muestra que no se puede conseguir de otra forma. Por ejemplo, los gráficos de temperatura de la muestra con respecto al tiempo obtenidos cuando se procesan muestras en los contenedores de muestras de la presente invención muestran puntas bruscas para las temperaturas de desnaturalización y reasociación (mostrando respuesta rápida de temperatura) como contraste a los tubos de plástico cónicos de la técnica anterior que requieren varios segundos para que toda la muestra alcance el equilibrio térmico. Además, los contenedores de muestras de la presente invención proporcionan resultados mejorados con respecto a la utilización de chips de silicio o cristal con ataque químico como contenedores de muestras, dado que los tiempos de ciclo térmico y la homogeneidad térmica de la presente invención son superiores que los tiempos de ciclo térmico y la homogeneidad térmica posible utilizando otros cuerpos o estructuras.

Utilizando la presente invención, se pueden discriminar muchos aspectos de la amplificación de ADN que hasta el momento habían sido poco comprendidos. Por ejemplo, la desnaturalización del producto tiene lugar en menos de un segundo, pero en la técnica anterior se requieren de diez segundos a un minuto de desnaturalización. Observando la fusión de producto por control de fluorescencia en tiempo real con colorantes de doble hilera, de acuerdo con la presente invención, (ver figuras 12 y 13) se demuestra que la utilización de tiempos de desnaturalización más cortos es muy eficaz. Como otro ejemplo, se han propuesto muchas causas del conocido "efecto plataforma", pero se dispone de pocos datos para distinguir entre las alternativas. Tal como se ha mostrado en la figura 13, la reasociación del producto es muy rápida. En realidad, durante ciclos posteriores de amplificación, la mayor parte del producto es reasociada cada ciclo durante el enfriamiento antes de alcanzar la temperatura de reasociación del cebador. Esto ocurre con velocidades de enfriamiento de 5-10°C/segundo llevando a cabo la presente invención. La reasociación del producto con dispositivos de ciclo de temperatura más lentos, según la técnica anterior, será incluso más elevada porque se requiere más tiempo para la transición entre la temperatura de desnaturalización y la de reasociación. Este efecto poco deseable limita el rendimiento del producto, y es una causa importante del "efecto plataforma" conocido en esta técnica.

Además, el dispositivo que se da a conocer proporciona un instrumento económico que se puede utilizar en aplicaciones comerciales y que controla de manera continuada la fluorescencia durante la amplificación de ciclo rápido. El dispositivo de ciclos térmicos de la presente invención es capaz de llevar a cabo amplificación de ADN en un tiempo no superior a 10-20 minutos y los componentes ópticos y de detección de la presente invención discriminan uno, dos, tres, o más fluoróforos. Las realizaciones preferentes de la presente invención controlarán un número de muestras individuales, por ejemplo, 24 muestras (tubos capilares de muestras -320- de la figura 11) desde una vez cada algunos segundos, preferentemente una vez por segundo, y más preferentemente diez veces por segundo.

Se encuentra dentro del alcance de la presente invención la preparación de muestras para procesar utilizando los aparatos de 96 pocillos conocidos y los tubos capilares de muestra (320), que son colocados entonces, en una de las realizaciones preferentes, por ejemplo, en el dispositivo de ciclos térmicos rápidos con detección de fluorescencia 1300 de la figura 11.

De manera ventajosa, las realizaciones preferentes de la presente invención utilizan realimentación de fluorescencia para control en tiempo real y optimización del proceso biológico, por ejemplo amplificación de ADN, al continuar el proceso. Por lo tanto, con las realizaciones preferentes que se dan a conocer en esta descripción, la fluorescencia que se detecta es utilizada para controlar los ciclos de temperatura. Utilizando realizaciones de la presente invención, tal como se da a conocer, y utilizando las técnicas de control continuo preferentes con tintes específicos de dsDNA, la extensión se terminará en cada ciclo térmico después de que la fluorescencia detectada termine de aumentar. Además, de acuerdo con la presente invención, las condiciones de desnaturalización son controladas asimismo por incremento de la temperatura solamente hasta que el producto se ha fundido por completo. Asimismo, de forma adicional, de acuerdo con la presente invención, la reasociación de un cebador es controlada con transferencia de energía de resonancia entre fluoresceína y oligonucleóticos etiquetados Cy5. Además, utilizando la presente invención, los ciclos de temperatura de la muestra se terminan de manera automática después de que una cantidad predeterminada de producto ha sido preparada.

Es posible, utilizando el aparato de la presente invención, producir ciclos rápidos de temperatura con tiempos mínimos de reasociación y desnaturalización que mejoran PCR cuantitativa e incrementan la discriminación de la

amplificación específica de alelos. Los ciclos rápidos para el secuenciado de ciclos reducen las ambigüedades de secuenciado y minimizan las “bandas de sombra” en amplificaciones de repetición de dinucleótidos. De acuerdo con la presente invención, para PCR largo hasta 35 kb, se mejora el rendimiento cuando la muestra es expuesta lo menos posible a elevadas temperaturas de desnaturalización.

En contraste a los enfoques anteriores a PCR que tratan PCR como tres reacciones, desnaturalización, reasociación, extensión, cada una de las cuales tiene lugar a tres temperaturas distintas (tal como se ha indicado en la figura 18A), un aspecto de la presente invención prevé que un paradigma simétrico para PCR consiga importantes mejoras. Utilizando un paradigma cinético para PCR (tal como se ha representado en la figura 18B), la curva de temperatura con respecto al tiempo consiste en transiciones continuas entre reacciones solapadas. El método y aparato de la presente invención son particularmente eficaces para llevar a cabo PCR bajo paradigma cinético. La figura 18C es un gráfico que representa diferentes perfiles de tiempo/temperatura próximos a una temperatura de reasociación de 55°C. En la figura 18C, las líneas continuas muestran una “punta” situada centralmente que representa la temperatura de respuesta de una muestra de 10 µl. Como contraste, las marcas indicadas en forma de segmentos con líneas cortas y largas de la figura 18C representan la respuesta de temperatura de muestras obtenidas utilizando instrumentos bloque de calentamiento. Tal como se puede apreciar de la figura 18C, las realizaciones de la presente invención producen “puntas” del segmento de reasociación, con las ventajas que se han discutido en contraste con las “plataformas” de temperaturas de acuerdo con el criterio convencional en esta técnica.

La instrumentación anteriormente conocida utilizada para la detección presentaba muchos inconvenientes. El sistema de la presente invención tal como se ha descrito, proporciona ciclos de temperatura rápidos y precisos en contraste con instrumentación anteriormente conocida que es de cinco a diez veces más lenta. Con el control de fluorescencia continua conseguido asimismo con el sistema de la presente invención, se puede seguir la dependencia de temperatura de la hibridación. Siguiendo la hibridación durante los ciclos de temperatura, se puede minimizar el número de sondas y/o colores espectrales requeridos. Es decir, se pueden detectar diferentes productos y mutaciones por sus características de fusión dinámica, en vez de pasar al engorro de sintetizar diferentes sondas etiquetadas con fluoróforos para cada especie de ADN que se desea detectar.

A efectos de dar a conocer una realización de una gran eficacia en cuanto a costes, un diodo emisor de luz de alta intensidad es utilizado en vez de una fuente de arco de xenón o un láser para iluminación de la muestra, y fotodiodos para detección. Las muestras son cargadas en tubos de muestras capilares de cristal, o alternativamente en contenedores de muestra de tipo compuesto cristal/plástico (ver figuras 21A-D) en un formato de 96 pocillos que no requiere sellado térmico. Por lo tanto, la presente invención da a conocer un análisis de fluorescencia en tiempo real de una gran eficiencia en cuanto a costes. El control de fluorescencia en tiempo real de los ciclos de temperatura mejora la calidad de la amplificación. Por ejemplo, si la temperatura de las muestras es incrementada solamente hasta que tiene lugar la desnaturalización, se minimiza la exposición del producto a temperaturas elevadas. Esto incrementa el rendimiento al limitar el producto y la degradación de la encima e incrementa la especificidad al limitar la amplificación de productos con una elevada temperatura de fusión.

A continuación se hará referencia a la figura 19, que muestra una representación esquemática de otra realización preferente de un ejemplo comparativo de la presente invención configurada para control continuo de una muestra única. No obstante, se comprenderá que las estructuras representadas en las figuras 19 y 20 pueden ser también incorporadas en un sistema que procesa de forma automática muestras múltiples, tales como el aparato representado en la figura 11 y tal como se explicará brevemente a continuación. En el ejemplo de la figura 19, un soporte de muestras único (402) está situado en un soporte de retención (404) dispuesto en la intersección de la corriente de aire con temperatura controlada y una trayectoria óptica lineal. El soporte de muestras (402) comprende un tubo (402A) que tiene muchas de las características deseables de un tubo capilar de acuerdo con la presente invención. Se pueden utilizar diferentes configuraciones de tubos capilares y el tubo (402A) tiene preferentemente sección transversal rectangular. La muestra biológica queda retenida preferentemente en el extremo inferior o de fondo del tubo (402A) tal como se ha indicado en (402B). Se dispone preferentemente una caperuza (402C) sobre el soporte de muestras (402).

A continuación se hará referencia a las figuras 19A-19E en las que se compara el efecto de diferentes configuraciones de contenedores de muestras sobre la respuesta de temperatura de la propia muestra. Los gráficos de temperatura-tiempo mostrados en la figura 19E corresponden a las respuestas obtenidas utilizando las configuraciones del contenedor de muestras que se han representado en las figuras 19A-C, respectivamente. La figura 19D representa un contenedor de muestras que es menos preferible para su utilización en la presente invención y que está incluido a efectos comparativos. Utilizando la información que se acompaña, los técnicos en la materia pueden llegar a conseguir configuraciones óptimas de contenedores de muestras para aplicaciones específicas de la presente invención. A continuación se indican otras informaciones con respecto a cada una de las configuraciones y contenedores de muestras representadas en las figuras 19A-D.

ES 2 304 573 T3

<u>Figura</u>	<u>Área</u> <u>superficial</u> <u>(mm³/10µl)</u>	<u>Longitud de la</u> <u>columna de</u> <u>fluido (mm)</u>	<u>Volumen de la</u> <u>muestra</u>	<u>Fuente de</u> <u>procedencia</u>
19A	77	47	10µl	Kimble KIMAX #46485-1
19B	42	13,8	34µl	Kimble KIMAX #46485-15
19C	32	B	59µl	Kimble KIMAX #34500-99
19D	18	N/A	10µl	Tubo MICROAMP™ de Perkin-Elmer Cetus GeneAmp PCR System 9600

En el aparato de la figura 19, se dispone una fuente de radiación de excitación (418), preferentemente un LED y más preferentemente un LED azul, para iluminar el soporte de muestras (402). La radiación emitida por la fuente de radiación de excitación (418) pasa a través de las lentes de enfoque esféricas (420) y un filtro de paso de banda de excitación (422) y la radiación es enfocada sobre el soporte de muestras (402).

Los componentes ópticos mostrados en la figura 19 son mantenidos preferentemente en el cuerpo envolvente óptico (412). También se dispone un cuerpo envolvente (406). Un ventilador (409) queda dispuesto para desplazar aire por el conducto de aire (414) y sobre el soporte de muestras (402) mantenido en el soporte de muestras (404). Una unidad de temperatura (410) queda situada en la trayectoria de flujo de aire proporcionando calentamiento o calentamiento y enfriamiento para el aire que pasa sobre el soporte de muestras (404). Una tobera (416) dirige de manera efectiva el aire sobre el soporte de muestras (404).

Las emisiones facilitadas por la muestra pasan a través de otras dos lentes esféricas (420) y un filtro de paso de banda de emisión (424) y son recibidas por un fotodetector (426), que preferentemente es un fotodiodo. Los técnicos en la materia pueden disponer fácilmente los componentes de control necesarios para el funcionamiento ventajoso del aparato representado en la figura 19 utilizando la información que se indica en esta descripción.

Las figuras 19F y 19G son vistas laterales y extremas, respectivamente, de un contenedor de muestras preferente (403) que utiliza un tubo capilar rectangular (403A). El tubo capilar (403A) es preferentemente un tubo que se puede conseguir de la firma Vitro Dynamics Inc. con dimensiones de 1 mm X 3 mm X 50 mm. Una primera caperuza (403B) y una segunda caperuza (403C) se mantienen unidas mediante un tornillo (403D), cuyo tornillo (403D) funciona también como soporte para el tubo capilar (403A).

Las figuras 19H y 19I muestran, respectivamente, dos posibles orientaciones de un tubo capilar rectangular (403A) en la detección de fluorescencia de la muestra contenida en el mismo. La figura 19H muestra el tubo capilar rectangular (403A) orientado de manera que sus bordes están alineados con el eje óptico de la óptica de excitación y de detección ("excitación y detección del borde"). La figura 19I muestra el tubo capilar rectangular (403A) orientado de manera que sus caras se encuentran alineadas con el eje óptico de la óptica de excitación y detección ("excitación y detección en la cara"). De manera sorprendente, la señal de fluorescencia obtenida de la orientación para la detección de borde mostrada en la figura 19H es aproximadamente desde el triple a cinco veces superior a la obtenida con la orientación de detección de la cara que se ha mostrado en la figura 19I. Las características deseables de utilizar la orientación de detección de borde mostrada en la figura 19H son debidas como mínimo a reflexión interna total que tiene lugar en el tubo capilar (403A) que concentra la señal de fluorescencia a los extremos del tubo capilar (403A).

La figura 20 muestra los componentes ópticos de otro ejemplo preferente de acuerdo con otro aspecto de la presente invención. Los componentes ópticos representados en la figura 20 se incorporan preferentemente en las estructuras de ciclos térmicos y de manipulación de muestras que se han representado en la figura 21, que se describirán brevemente de manera más completa, pero que también se pueden utilizar con muchas disposiciones distintas para proporcionar control (muy preferentemente control continuo) de una muestra sometida a reacción de cadena de polimerasa.

En contraste con las disposiciones que previamente se han dado a conocer, las trayectorias ópticas de excitación y detección se combinan en el ejemplo de las figuras 20 y 21, a las que se hace referencia en esta descripción como

trayectoria epifluorescente, en vez de trayectoria lineal. En el ejemplo de las figuras 20 y 21, la radiación de excitación y emisión sigue la misma trayectoria óptica entre el tubo capilar y el elemento dicróico utilizado en la trayectoria de excitación. Un tubo capilar está particularmente adaptado para su utilización en las realizaciones de las figuras 20 y 21 debido a la reflexión interna total (a la que se hace referencia también como “conductos de luz”) a lo largo del tubo de muestra capilar, lo que se explota para incrementar las intensidades de excitación y emisión.

En la realización de las figuras 20 y 21, para adaptarse a conductos de luz máximos, el eje óptico es paralelo a la longitud del tubo capilar (paraxial) con la punta del tubo capilar dispuesta en el punto focal. Suponiendo un índice de refracción aproximado de 1,33 para la muestra objeto de detección, aproximadamente 12,39 de la luz emitida es guiada a la punta. Se comprende que se puede utilizar acción centrífuga para desplazar la muestra a la punta del tubo capilar.

Los gráficos de la figura 22A muestran la eficacia de los conductos de luz cuando se efectúa detección de fluorescencia en la punta del tubo capilar y muestra un incremento de 10 veces en la intensidad de la señal al observar la punta (diamantes cerrados) en vez del lado (círculos abiertos) del contenedor de muestras capilar. Asimismo, tal como se ha indicado en la figura 22B, los resultados obtenidos utilizando tubos de muestras capilares de dos tamaños distintos, que son llenados a diferentes longitudes con dsDNA tintado con SYBR® Green I, se han mostrado en forma de gráficos. Tal como se puede deducir de las figuras 22A y 22B, la epifluorescencia observada aumenta al añadir una cantidad mayor de muestra al tubo, si bien la eficacia de la fluorescencia disminuye.

Las características ópticas de la emisión de un capilar fueron investigadas por estimulación de fluorescencia en un capilar lleno con una solución de fluorescencia a 470 nm. La emisión desde el extremo romo del capilar se observó homogénea a través de la cara del capilar en oposición a la concentración en el cristal que se podría esperar si la emisión fuera el resultado de fluorescencia en ondas evanescentes.

Los componentes ópticos representados en la figura 20 llevan a cabo la iluminación epifluorescente paraxial de la punta del capilar, lo que proporciona resultados ventajosos que no se pueden conseguir de otro modo. En la figura 20, una fuente de radiación de excitación (468) es preferentemente un LED azul, tal como el conocido en la industria como LED super brillante que se puede conseguir de la firma LEDtronics. Las señales de fluorescencia emitidas son captadas por fotodetectores (466A) y (466B). La fuente de radiación de excitación (468) y los fotodetectores (466A) y (466B) están soportados sobre un panel de montaje (468) que comprende también los necesarios circuitos y que integra filtros con los fotodetectores (466A) y (466B). Un panel de montaje preferente es el que se puede conseguir de la firma Ealing Electrooptics que comprende filtros de interferencia de 0,5 pulgadas con fotodiodos de silicio de alto rendimiento en envases TO5. Los componentes de excitación y detección están soportados directamente sobre el panel de montaje (468) con la electrónica asociada. Es preferente que los componentes ópticos sean preferentemente de 1,0 pulgadas de diámetro. Una lente colimadora (454), dos filtros dicróicos (456A) y (456B), un espejo (458), filtros de interferencia (460A-C), y lentes de enfoque esféricas (462A-C) dirigen la radiación hacia y desde la muestra.

Mientras la realización de la presente invención representada en la figura 20 utiliza solamente dos colores/longitudes de onda cuando se lleva a cabo análisis, los técnicos en la materia podrán adaptar fácilmente la realización para conseguir tres, o más, análisis de color. Para conseguir tres o más análisis de color, el aparato representado en la figura 20 puede recibir otros filtros dicróicos y fotodetectores. Además, se encuentra dentro del ámbito de la presente invención el permitir separación simultánea de longitudes de onda sobre un conjunto de fotodetectores de tipo lineal, tal como se encuentra en la industria, para captación multicolor. Cuando se utiliza un conjunto detector fotolineal de acuerdo con la presente invención, es preferible que se utilice un prisma o una rejilla de difracción en cooperación con una lente y conjunto de fotodetector o CCD para detección de longitudes de onda múltiples. Un fotodetector lineal preferente que se encuentra a disposición en la industria recoge 15-30 sectores de longitud de onda de 10-20 nm cada uno de ellos entre 500 y 800 nm. Diferentes configuraciones de componentes ópticos, como por ejemplo la configuración autocolimadora Littrow para rejillas utilizadas en la mayor parte de monocromómetros, se pueden conseguir utilizando la información que se desprende de la presente descripción para conseguir la mejor adecuación entre eficacia de captación, resolución espectral y exigencias espaciales. El aparato de la figura 20 se describirá a continuación incorporado a un aparato de ciclos térmicos automático representado en la figura 21.

La figura 21 muestra una representación esquemática de otro aparato (400) que incluye componentes de ciclo rápido de temperatura, componentes de manipulación de muestras, y los componentes ópticos representados en la figura 20, funcionando todos ellos conjuntamente para conseguir detección de fluorescencia en la punta de los contenedores de muestras (epifluorescencia). El aparato de ciclos rápidos de temperatura con detección de epifluorescencia (400) que se ha representado en la figura 21 proporciona ventajas específicas. Se comprenderá que esta realización que se ha descrito muestra simplemente un ejemplo de la presente invención y que los técnicos en la materia pueden idear muchas disposiciones distintas para llevar a cabo la presente invención tal como se reivindica.

En el ejemplo representado en la figura 21, se toma aire a través de la abertura (470) y sigue en general la trayectoria de flujo indicada por las líneas (472). La temperatura del aire y por lo tanto la temperatura del tubo capilar (450) de plástico/cristal, se ajusta preferentemente utilizando un cartucho de calentamiento (474) de 400 vatios que se puede conseguir preferentemente de la firma Reheat, Inc. El cartucho de calentamiento (474) está posicionado dentro de un conducto central (476). Un ventilador (498) está dispuesto para desplazar el aire en la trayectoria indicada (472). El ventilador es impulsado por el eje (496) y el motor (494). El motor (494) es preferentemente un motor de escobillas de tierras raras de corriente continua que se puede conseguir preferentemente de la firma Escap AG. y que tiene

un máximo de régimen de 15.000 rpm. Cuando se efectúa el calentamiento de los tubos (450) de plástico/cristal, el cartucho de calentamiento es controlado de manera proporcional y el ventilador funciona a una velocidad relativamente baja (12 voltios, 0,5 amperios) para proporcionar homogeneidad de temperatura para la totalidad de contenedores (450) de muestras de plástico/cristal. Cuando se efectúa el enfriamiento de los tubos (450) de plástico/cristal, el cartucho de calentamiento (474) es desactivado y el motor (494) funciona a una velocidad rápida (por ejemplo, con el motor preferente antes mencionado, la máxima velocidad se obtiene al aplicar 27 voltios, 1,4 amperios). El ventilador (498) obliga al aire hacia adentro de la abertura (470), saliendo por las aberturas de salida (471).

En el dispositivo preferente de ciclos rápidos de temperatura con detección de epifluorescencia (400), es preferible que se dispongan simétricamente alrededor del cartucho de calentamiento (474) y conducto central (476), veinticuatro tubos capilares (450) de plástico/cristal (dos de los cuales se han mostrado en la figura 21). Los tubos (450) de plástico/cristal quedan alojados en manguitos (451) que (debido a su estructura desplazada) permiten un ajuste preciso de la posición de los tubos capilares (450) individuales de plástico/cristal en un carrusel circular (480). Los manguitos (451) están fabricados preferentemente a partir de latón. La estructura de eje desplazado del manguito (451) permite que cada uno de dichos manguitos (451) sea alineado, de manera que la punta del tubo (450) de cristal/plástico puede ser ajustada de manera precisa para que se encuentre en el punto focal óptico representado en la figura 21, tanto lateralmente como longitudinalmente, en el momento en el que se fabrica el dispositivo de ciclos de temperatura rápidos con detección de epifluorescencia (400).

El carrusel (480) es soportado sobre un cojinete (482) por encima de un cuerpo envolvente (490). El carrusel (460) es posicionado por un motor paso a paso (488) dotado de un dispositivo de impulsión (484) conectado al motor (488) por intermedio del eje (486). El motor paso a paso (488) es accionado (paso a paso mediante un controlador (no representado explícitamente en la figura 21) de la firma New England Affiliated Technologies) para proporcionar más de 10.000 pasos por revolución del carrusel (480), proporcionando un posicionado preciso de cada uno de los tubos (450) de plástico/cristal. El interior del cuerpo envolvente (490) está dotado de material aislante (492), preferentemente de acuerdo con el material aislante anteriormente descrito. Los deflectores (476) funcionan formando la abertura de salida (471) y bloquean la luz ambiente.

Las figuras 21A-D proporcionan vistas detalladas adicionales de los tubos (450) de plástico/cristal y se hará referencia a ellas para la explicación del método preferente de utilización de los mismos. El tubo (450) de plástico/cristal comprende una parte de tubo capilar (450B) cerrada por un extremo. La parte de tubo capilar (450B) puede adoptar muchas configuraciones y no está limitada solamente a la estructura del tubo capilar. No obstante, es preferible que el volumen de fluido retenido por los tubos (450) de plástico/cristal no sea superior a 1 mililitro a efectos de favorecer la homogeneidad de la temperatura de la muestra y los ciclos térmicos rápidos. Por ejemplo, es preferible que el material del que se ha fabricado la parte (450B) de tubo capilar tenga una conductividad térmica dentro de una gama de valores de 20 a 35 de acuerdo con la fórmula $\left(\frac{\text{cal cm}}{\text{cm}^2 \text{s grados C}} \right) \times 10$. Otras informaciones referentes a conductividad térmica

de diferentes cristales se puede conseguir de la publicación de R.C. Weast & M.J. Astle, HANDBOOK OF CHEMISTRY AND PHYSICS, página E-6 (1992) (CRC Press). Los tubos de plástico/cristal (450) están dotados también de una parte de contenedor (450C) fabricada preferentemente a partir de un material plástico apropiado y unida al extremo abierto de la parte (450B) del tubo capilar. Si bien se pueden utilizar muchos materiales distintos para la parte del recipiente (450C), es preferible que el material plástico sea conformado con una estructura en forma de embudo, siendo fijado a la parte de tubo capilar (450B).

La muestra (S) es cargada en el tubo (450) de tipo combinado de plástico/cristal utilizando una pipeta (P), u otro instrumento apropiado, manualmente o utilizando un proceso automatizado. Es preferible que el volumen de la muestra se encuentre en una gama de valores aproximadamente de 0,01 μl a 10.000 μl , más preferentemente en una gama aproximada de 0,01 μl hasta 100 μl , y de modo más preferente en una gama de 0,01 μl hasta 10 μl , siendo el volumen más preferente de unos 5 μl . Una vez que la muestra ha sido añadida a cada tubo (450) de plástico/cristal, los tubos (450) de plástico/cristal son centrifugados a baja velocidad para colocar las muestras en las puntas del extremo cerrado de la parte capilar (450B), de manera que la muestra forma una columna de fluido 0,2-2,0 cm indicada con el numeral (450A), tal como se ha representado en la figura 21B. Un tapón (450D) (preferentemente configurado en forma de tapón de plástico) es colocado a continuación en la parte del recipiente (450C) para cerrar de forma estanca el tubo (450) de plástico/cristal, tal como se ha mostrado en la figura 21C, y el tubo (450) de plástico/cristal es colocado en el manguito (451) del dispositivo de ciclos rápidos de temperatura con detección de epifluorescencia (400). Se pueden utilizar diferentes estructuras para sellar la parte de tubo capilar (450B).

La parte (450B) del tubo capilar del tubo (450) de cristal/plástico es preferentemente un tubo capilar hecho de cristal disponible en la industria, que tiene un diámetro interno de 0,8 mm y un diámetro externo de 1,0 mm, y que está cerrado/sellado en un extremo y abocinado en el otro para recibir el recipiente de plástico (450C). Los contenedores de muestras (450) de cristal/plástico pueden ser fabricados de manera fácil y económica. La forma de la punta (450E) de la parte (450B) del tubo capilar es optimizada para conseguir eficiencia óptica. Se prevén dentro del ámbito de la presente invención puntas planas y también puntas con diferentes curvaturas exteriores e interiores. Los técnicos en la materia podrán seleccionar la configuración más eficaz para dicha punta.

Tal como se puede deducir de las figuras 21A-D, la adición de estructuras de carga de plástico y de estanqueización a un tubo capilar proporciona grandes ventajas y permite una utilización eficaz de los tubos capilares de cristal conser-

vando sus características térmicas deseables. Se aprecia que está dentro del alcance de la presente invención añadir las muestras a los recipientes de muestra de plástico/cristal (450) y someter las muestras a centrifugación, en un formato de 96 celdas. Además, se encuentra dentro del alcance de la presente invención cargar individualmente los recipientes de muestra de plástico/cristal en el aparato de ciclos rápidos de temperatura con detección de epifluorescencia (400) y también se encuentra dentro del alcance de la presente invención dar a conocer una realización de la presente invención para cargar los recipientes de muestra de plástico/cristal (450) en un formato de 96 celdas o en algún otro formato.

De manera ventajosa, el tubo (450) de tipo combinado de plástico/cristal, proporciona un soporte de muestras económico y conveniente. Con el ejemplo de la figura 21, es preferible que se capte la fluorescencia a partir de muestras únicas una a diez veces por segundo. Cuando se capta fluorescencia de muestras múltiples a la velocidad preferente, es necesario que las muestras sean desplazadas a su posición por rotación del carrusel (460) de manera relativamente rápida. Con el motor paso a paso preferente (480) y dispositivos de control apropiados (que se pueden seleccionar utilizando la información contenida en esta descripción), cada una de las veinticuatro muestras pueden ser desplazadas de forma rápida y precisa a la posición de control representada en la figura 21.

Cuando la señal fluorescente de cada muestra es captada durante 100 mseg., la variación de señal (con reposicionado) es <1%. Se observará que se encuentra dentro del alcance de la presente invención disminuir el tiempo de captación de la señal, incrementar las velocidades de tránsito, y asimismo observar el coeficiente de variación a partir de muestreo repetido. Cuando se procesan veinticuatro muestras, y el carrusel se hace girar sin parar a una velocidad comprendida entre una y diez revoluciones por segundo, cada una de las muestras tiene un período de excitación y detección de 0,37-3,7 mseg.

Utilizando la información que se ha indicado, los técnicos en la materia pueden seleccionar si la señal fluorescente está integrada a través del software o del hardware. En una realización preferente, se utiliza un lenguaje de programación gráfica en relación con el dispositivo de ciclos rápidos de temperatura con detección de epifluorescencia (400), tal como el conocido en la industria como LabView (que se puede adquirir de la firma National Instruments), que tiene subprogramas para detección de máximos o picos y para integración. En otra realización preferente, la integración se lleva a cabo en el hardware con tiempo de integración variable (control de sensibilidad ajustable por el usuario) de manera que las señales alcanzan un nivel óptimo para conversión analógica a digital.

Utilizando el dispositivo de ciclos rápidos de temperatura con detección de epifluorescencia (400) representado en la figura 21, el control continuado de la muestra al proceder la reacción, permite una determinación de las exigencias del ciclo de temperatura durante la amplificación, basándose en la observación continua de la reasociación, extensión y desnaturalización. Esto contrasta con la técnica anterior en la que todos los parámetros del ciclo son determinados y programados antes de empezar la amplificación. De acuerdo con la técnica anterior, utilizando oligonucleótidos complementarios equivalentes al cebador con punto de fusión más bajo, la eficacia de la reasociación es controlada incluso durante los primeros ciclos. En cualquier caso, la extensión y desnaturalización pueden ser controlados solamente con colorantes dsDNA durante ciclos posteriores cuando se ha preparado suficiente producto. De modo significativo, esta exigencia no es habitualmente un problema porque las condiciones de desnaturalización y de extensión son suficientemente flexibles para amplificar la mayor parte de productos, y los datos de la primera amplificación pueden ser utilizados para optimizar pasadas siguientes.

Haciendo referencia adicionalmente a la figura 21, se pueden preparar un interfaz de usuario y un control de instrumentos (500) utilizando la información de la presente descripción en relación con la realización de la figura 11. Como ejemplo preferente de interfaz de usuario y de control de instrumentos (500), un microordenador PENTIUM™ que trabaja con el lenguaje de programación LabView con una tarjeta de entrada/salida multifunción de 12 bits (de la firma National Instruments) proporciona captación de datos y control. Es preferible que las señales de salida analógica sean utilizadas para ajustar los amplificadores asociados con los fotodetectores (466A) y (466B). Los canales de entrada analógicos miden asimismo la temperatura de las muestras mediante un termopar (499) así como el fluorescente detectado desde la muestra por los fotodiodos. El interfaz de usuario y control de instrumentos (500) representado en la figura 21 proporciona también control digital I/O de la fuente de radiación de excitación (468), de la dirección del motor paso a paso (469), del cartucho de calentamiento (474), y del ventilador (496).

Cuando se pueden utilizar supervisión de fluorescencia continuada de muestras PCR conteniendo el colorante dsDNA SYBR® Green I o sondas de oligonucleótidos etiquetadas de forma fluorescente para controlar la hibridación y fusión durante ciclos de amplificación individuales. Esta información puede ser utilizada por dispositivos preferentes para el interfaz de usuario y control de instrumento (500) para proporcionar condiciones de ciclos térmicos mejoradas y adaptadas a cada caso. Las ventajas de utilizar información de hibridación para ciclos de temperatura incluyen:

(A) Asegurar que tiene lugar una desnaturalización completa del producto PCR con cada ciclo y simultáneamente:

Minimizar la exposición a temperaturas de desnaturalización excesivamente elevadas, evitando, de esta manera, daños inducidos por el calor en los productos de amplificación y en la polimerasa.

Incrementar la especificidad de la reacción minimizando la temperatura de desnaturalización que selecciona contra productos con un valor T_m más elevado que el producto de amplificación deseada.

ES 2 304 573 T3

- (B) Hacer máxima la eficacia de amplificación asegurando el tiempo adecuado para la extensión del producto con cada ciclo y simultáneamente:

Minimizar la cantidad de tiempo requerida para amplificación al no permitir más tiempo del necesario para completar la extensión del producto.

Fomentar la especificidad de la reacción al seleccionar contra productos más largos que el producto de amplificación deseado.

- (C) Hacer máximo el rendimiento de amplificación al asegurar el tiempo adecuado para la extensión de producto de cada ciclo y simultáneamente:

Minimizar la cantidad de tiempo requerido para amplificación al no permitir tiempos más largos de lo necesario para completar la extensión del producto.

Fomentar la especificidad de la reacción al seleccionar contra productos con mayor longitud que el producto de amplificación deseado. Estos requerirían más tiempo que el concedido para completar la extensión del producto.

- (D) Iniciar cambios de ciclo térmico dependientes del nivel de fluorescencia obtenido o de la eficiencia momentánea de la amplificación. Por ejemplo, se puede hacer mínima la sobreamplificación y productos de reacción no específicos al terminar los ciclos térmicos cuando el rendimiento desciende a un nivel determinado. Como otro ejemplo, los ciclos de temperatura se pueden modificar para iniciar rampas de temperatura más lentas para la captación de la curva de fusión cuando la fluorescencia resulta detectable. Esto ahorra tiempo porque las rampas más lentas no deben ser utilizadas en ciclos iniciales. Otros cambios deseables pueden resultar evidentes de la práctica continuada de la invención.

- (E) Minimizar los daños por sobreamplificación al producto PCR y/o iniciación de la captación de la curva de fusión antes de que la sobreamplificación ha incrementado el fondo de los productos de reacción no específicos.

El interfaz de usuario y control de instrumentos (500) puede seguir los puntos de ajuste de tiempos/temperaturas preprogramados y/o, de manera ventajosa, pueden detectar valores de fluorescencia detectados y a continuación utilizar los valores de fluorescencia detectados y captados para alterar o ajustar uno o varios parámetros de reacción en tiempo real para optimizar los resultados obtenidos. Tal como se utiliza en esta descripción, el término "parámetro de reacción" incluye, sin que ello sirva de limitación, cualquier parámetro utilizado como base para controlar una reacción. Estos parámetros de reacción comprenden, sin que ello sirva de limitación, la temperatura y el tiempo de desnaturalización, temperatura y tiempo de reasociación del cebador, temperatura y tiempo de reasociación de la sonda, temperatura y tiempo de extensión de la encima y número de ciclos. En general, el control de la reacción se basa inicialmente en la estimación de parámetros de reacción a partir de los datos de fluorescencia. Los datos de fluorescencia originales son captados como cambio de la fluorescencia a lo largo del tiempo (tasas específicas de temperatura o desnaturalización, reasociación y extensión), cambio en fluorescencia según la temperatura (T_m de producto o sonda), o cambio de la extensión de amplificación (rendimiento de la amplificación y eficiencia). Estos valores, T_m s, y sus primera y segunda derivadas se utilizan para determinar los parámetros de reacción óptimos tales como temperatura y tiempo de desnaturalización, temperatura y tiempo de reasociación del cebador, temperatura y tiempo de reasociación de la sonda, temperatura y tiempo de extensión de la encima y número de ciclos.

Tal como se ha mostrado en el bloque de alto nivel de la figura 22C, las tareas se dividen entre las llevadas a cabo por una parte del interfaz de usuario y control de instrumentos (500) (que preferentemente puede ser un ordenador compatible con IBM utilizando programación basada en las informaciones indicadas) (bloques -500A-500E- de la figura 22C) y las llevadas a cabo por los componentes restantes (bloques -500A-, y -500G-500S- de la figura 22C) del dispositivo de ciclos rápidos de temperatura con detección de epifluorescencia (400). Se comprenderá que el diagrama de bloques de la figura 22C es meramente a título de ejemplo.

Como ejemplo de las ventajas de la disposición mostrada en la figura 22C, se explicará el control de fusión del producto. Se capta un valor de fluorescencia máxima de fusión para el producto PCR deseado y se capta una fluorescencia de línea base para la muestra que contiene la mezcla de reacción y la temperatura a la que se observa que el producto se ha fundido por completo. Cada ciclo de la reacción utiliza este valor de fluorescencia como objetivo. El enfoque que se describe en este ejemplo utiliza dos etapas para proporcionar un retardo de tiempo para adaptarse a la exigencia de envío de los valores de fluorescencia a un ordenador PC separado. Con cada etapa de fusión del producto, la temperatura se incrementa hasta que la fluorescencia alcanza un valor intermedio, a continuación la potencia aplicada al dispositivo de calentamiento se reduce de manera que se impone una rampa de temperatura de 3°C por segundo aproximadamente, de manera que el ordenador PC tiene el tiempo adecuado para analizar la fluorescencia y comunicar a otros componentes que ha tenido lugar la desnaturalización del producto. El gráfico resultante de tiempo/temperatura se muestra en la figura 22D. La figura 22D muestra un incremento característico en la temperatura de fusión después de veinte ciclos al aumentar la concentración de producto de amplificación. Esto es debido al hecho de que el producto T_m es una función de la concentración del producto.

ES 2 304 573 T3

Como ejemplo de otras ventajas de la disposición mostrada en la figura 22C, se explicará la reasociación/extensión del producto. Durante una retención prolongada a una temperatura combinada de reasociación/extensión, se controla la fluorescencia de la muestra y esta información es utilizada para asegurar que se ha permitido un tiempo adecuado, pero no excesivo, para la extensión del producto. La fluorescencia es controlada a intervalos de diez segundos, y si la fluorescencia incrementa en más de una proporción predeterminada (típicamente de 1,00 a 1,05), entonces se continúa la etapa de reasociación/extensión. De otro modo, se inicia la siguiente etapa de fusión del producto. El intervalo de diez segundos se escoge para conseguir un mínimo de veinte segundos a la temperatura combinada de reasociación/extensión.

La figura 22B muestra un gráfico de fluorescencia/tiempo que muestra un incremento característico en el tiempo de permanencia a la temperatura combinada de reasociación/extensión al aumentar la concentración de amplificación del producto. Esto es debido al hecho de que al resultar limitadora la concentración del cebador y la polimerasa, se requiere más tiempo para completar la extensión del producto dentro de cada ciclo.

Como otro ejemplo adicional de las ventajas de la disposición mostrada en la figura 22C, se explicará la plataforma de amplificación. Al final de cada etapa de reasociación/extensión, se capta y se almacena el valor de la fluorescencia. Cuando este valor aumenta a 1,2 veces el valor de la fluorescencia más bajo de final de ciclo y se ha parado a continuación el incremento por debajo de una proporción de usuario ajustable (típicamente 1,00-1,02), se termina el ciclo térmico. De manera alternativa, se inicia una etapa de determinación de la curva de fusión entrando en una rampa lenta de temperatura de 0,1°C a 0,2°C/segundo pasando para el T_m del producto y controlando la fluorescencia de la muestra de manera continua. El gráfico resultante de fluorescencia/tiempo mostrado en la figura 22D muestra que después de veinticinco ciclos de amplificación, la proporción de crecimiento de fluorescencia ciclo a ciclo disminuyó por debajo de 1,00 y terminó la reacción. Se observará que este enfoque puede ser utilizado para captar una curva de fusión de alta resolución para cada muestra. Al alcanzar una muestra su plataforma de amplificación, se puede captar una curva de fusión para dicha muestra, a continuación los ciclos de temperatura regulares pueden reanudarse hasta que otra reacción alcanza su plataforma de amplificación.

La figura 22E muestra segmentos útiles de temperatura con respecto al tiempo para control de la hibridación de fluorescencia. Las curvas de fusión del producto se obtienen durante un incremento lento de temperatura hasta la desnaturalización. Al reducir de manera rápida la temperatura después de la desnaturalización a una temperatura constante, se pueden detectar el producto, sonda, o reasociación del cebador. Se obtienen curvas de fusión de la sonda al calentar lentamente pasando por temperaturas alrededor de T_m de la sonda. Los técnicos en la materia podrán utilizar fácilmente el sistema representado en la figura 21 para conseguir el análisis necesario si se desea tiempo real, durante los ciclos de temperatura para conseguir información que hasta el momento no era accesible sobre las características del producto, sonda, y cebador utilizando el hardware y el software que se han descrito.

También se lleva a cabo una cuantificación absoluta del producto, de manera ventajosa, de acuerdo con la presente invención. El control continuado de formación de ADN de doble hilera, permite la cuantificación absoluta y directa de ADN por cinética de reasociación. La temperatura de la muestra desciende rápidamente desde la temperatura de desnaturalización y se mantiene constante a una temperatura más baja que todavía es suficientemente elevada para impedir la reasociación del cebador. La velocidad de reasociación del producto sigue a continuación una cinética de segundo orden. Cuando se comprueban diferentes concentraciones de ADN, la forma de la curva de reasociación es característica de la concentración de ADN (ver figura 26). Para cualquier producto PCR y temperatura determinados, se puede medir una constante de segundo orden. Una vez se conoce la constante de velocidad, se puede determinar cualquier concentración desconocida de ADN a partir de datos experimentales de reasociación. Las curvas pueden acoplarse a una regresión no lineal de mínimos cuadrados durante ciclos de temperatura en tiempo real utilizando programación LabView (explicada anteriormente). La refrigeración no es instantánea, y tiene lugar una cierta reasociación antes de alcanzar una temperatura constante, pero el análisis de regresión permite este efecto, de acuerdo con la presente invención. La técnica requiere producto PCR puro, pero esto se puede verificar por las curvas de fusión obtenidas también durante los ciclos de temperatura. La cuantificación por cinética de reasociación es independiente del nivel de señal y no está afectada por diferencias de volumen de la muestra.

La figura 28 es una representación esquemática de otro aparato que comprende muchas de las estructuras incluidas en la realización de la figura 21. A efectos de proporcionar una descripción sucinta de la realización de la figura 28, solamente se explicarán las diferencias significativas entre los componentes representados en la figura 21 y los componentes representados en la figura 28 para el entendimiento de que un técnico en la materia pueda utilizar fácilmente la información contenida para fabricar realizaciones en la presente invención. Las figuras 27A y 27B son vistas esquemáticas en sección de la realización representada en la figura 26 en una modalidad de funcionamiento y modalidad de carga, respectivamente.

La realización de la figura 28 es un dispositivo de ciclos rápidos de temperatura, indicado de modo general con el numeral (502), con detección de fluorescencia en la punta de los tubos capilares con posicionado automático de los contenedores de muestras en dos dimensiones, lo que mejora la señal de fluorescencia que es obtenida a partir de la muestra. La figura 29 es una vista en perspectiva del exterior de un aparato que incluye los componentes ilustrados en la representación esquemática de la figura 28.

ES 2 304 573 T3

Tal como se aprecia en las figuras 28 y 29, una bandeja circular desmontable (483) para las muestras soporta treinta y dos muestras. La bandeja de muestras circular desmontable (483) es colocada en el dispositivo de ciclos de temperatura rápidos (502) de manera que se acopla a un carrusel (481) que es impulsado por el motor (488). Al girar el carrusel (481), se utiliza un localizador de posición de efecto Hall para posicionar de manera precisa el carrusel (481), de manera que cada muestra es posicionada de manera precisa sobre el conjunto del fluorímetro (459). El conjunto del fluorímetro (459) incluye preferentemente una fuente (459A) del LED, tres fotodiodos (459B), lentes de enfoque (459C), y un conjunto de filtro (459D). El conjunto del fluorímetro (459) es similar en estructura y función al representado en la figura 20.

De manera más ventajosa, el fluorímetro está montado sobre un cojinete deslizante (493) que es desplazado por un motor paso a paso lateral (491). Al girar el carrusel (481), los tubos combinados de plástico/cristal (450) son posicionados de manera precisa sobre el conjunto del fluorímetro (459) en la dirección del carrusel y la posición es anotada por el aparato mediante el localizador de posición de efecto Hall (495) mientras el motor paso a paso lateral (491) ajusta el posicionado del conjunto del fluorímetro (459) ajustado en una segunda dimensión y se anota la posición. De este modo, el dispositivo (502) de ciclos rápidos de temperatura proporciona una colocación mejorada de una serie de muestras en el aparato utilizando una bandeja de muestras desmontable (483) y proporciona la detección mejorada de la señal de fluorescencia procedente de una muestra.

En las figuras 30A-30V se han mostrado de manera esquemática diagramas que muestran la configuración preferente de los componentes eléctricos del dispositivo de ciclos rápidos de temperatura (502) representado en las figuras 28 y 29. Se debe comprender que los diagramas de las figuras 30A-30V son meramente una disposición preferente para llevar a cabo aspectos particulares de la presente invención y dichos diagramas no están destinados a limitar el ámbito de la misma. Para mejorar la claridad de los diagramas, se indicarán en la lista de piezas correspondiente que se adjunta las anotaciones que se utilizan habitualmente en la industria.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 304 573 T3

Lista de piezas - PRINCIPAL			
Elemento	Cantidad	Referencia	Parte
1	1	BT1	3V LITHIUM
2	9	C1, C2, C3, C8, C9, C13, C18, C24, C26	10P
3	7	C4, C5, C10, C12, C14, C15, C17	10P
4	2	C7, C6	1000P
5	6	C11, C16, C19, C20, C21, C22	18pF
6	1	C23	470P
7	2	C25, C27	220P
8	2	C28, C29	100P
9	1	F1	1A
10	1	IC1	AD594
11	2	IC2, IC3	DS5000FP
12	1	IC4	LM324
13	8	IC5, IC7, IC10, R13, R17, R18, R21, R22	10K
14	2	IC6, IC8	MS62256
15	2	IC9, IC10	DS2003
16	1	IC11	TLC1451
17	1	IC12	7432
18	1	IC13	PT5101
19	1	IC14	PT5102
20	1	IC15	7404
21	1	IC16	PIC16C54
22	1	IC17	MAX232
23	1	IC18	LM4040
24	1	IC19	LTC1293
25	1	IC20	LTC1296
26	1	IC21	LM385 1.2
27	1	IC22	LTC1144
28	2	IC23, IC24	PVG612S

ES 2 304 573 T3

Lista de piezas - PRINCIPAL			
Elemento	Cantidad	Referencia	Parte
29	1	JP1	DETECTOR PRINCIPAL
30	1	JP2	FLO1
31	1	JP3	FLO3
32	1	JP4	FLO2
33	1	JP5	CABEZAL PRINCIPAL
34	1	J1	CON2
35	1	LED1	ETAPA
36	1	LED2	TEMP
37	2	LED3, LED4	LED ROJO/VERDE
38	1	P1	CONECTOR SERIE
39	1	Q1	2N5184
40	10	Q2, Q3, Q4, Q5, Q6, Q7, Q8, Q9, Q10, Q11	NDS351
41	1	R1	4.87K 1%
42	4	R2, R4, R5, R6	10K 1%
43	1	R3	2.74K 1%
44	1	R7	200
45	8	R8, R9, R10, R11, R19, R20, R28, R29	470
46	2	R13, R12	100
47	3	R14, R16, R23	1K
48	4	R24, R25, R26, R27	4.7K
49	1	S1	TIPO J
50	1	Y1	20.0000
51	2	Y3, Y2	14.745600

ES 2 304 573 T3

Lista de piezas - PANEL POTENCIA			
Elemento	Cantidad	Referencia	Parte
1	3	C1, C5, C6	330UF
2	1	C2	47UF
3	1	C3	1000UF
4	1	C4	22UF
5	1	C7	100UF
6	1	C8	220UF
7	5	C9, C10, C11, C12, C13	.1UF
8	2	C15, C14	10UF
9	2	DR1, DR2	IM481H
10	1	D1	1N5232
11	2	D2, D4	1N4755
12	2	D5, D3	11DQ05
13	1	F1	2A
14	4	IC1, IC2, IC3, IC4	HCPL2630
15	1	IC5	LM2574hv8
16	2	IC7, IC6	PVG612S
17	1	IC8	MOC 3020
18	1	IC9	TLQ1451
19	1	IC10	LM324
20	1	IC11	PUNTE
21	1	IC12	LTC1144
22	1	JP1	CABEZAL 14
23	2	JP2, JP3	CABEZAL 4
24	1	JP4	CABEZAL 12
25	2	L2, L1	330UH
26	1	Q1	4008
27	9	R1, R2, R4, R5, R6, R7, R8, R9, R10	470

ES 2 304 573 T3

Lista de piezas - PANEL POTENCIA			
Elemento	Cantidad	Referencia	Parte
28	1	R3	360
29	7	R11, R13, R14, R16, R17, R18, R19	10K
30	1	R12	4.7K
31	1	R15	1K
32	1	R20	261
33	1	R21	866
34	1	R22	650
35	1	R23	180
36	2	S1, S2	110/220
37	2	T1	TRANSFORMADOR COMPACTO PLANO
38	1	VR1	LM2575

Lista de piezas - INTEGRADOR			
Elemento	Cantidad	Referencia	Parte
1	2	C1, C2	1uF
2	1	C3	.01
3	1	IC1	ACF2101
4	1	IC2	OPT301
5	1	IC3	OPA627
6	1	IC4	REF200
7	1	J1	CON6
8	1	P1	500
9	1	R1	30M
10	1	R2	100K
11	2	R3, R4	10K

Lista de piezas - INTEGRADOR			
Elemento	Cantidad	Referencia	Parte
12	2	R5, R6	100

Lista de piezas - EFECTO HALL			
Elemento	Cantidad	Referencia	Parte
1	1	IC1	HAL115
2	1	J1	CON3
3	1	R1	10K

Se incluye un código de programación a título de ejemplo en relación con los componentes de las figuras 28, 29, y 30A-30V en el código de programación, apéndice B, adjunto a la descripción, e incorporado a título de referencia.

Según otra realización de la presente invención, se dispone un sistema de manipulación para la carga de recipientes de muestra de pequeño volumen con muestras de líquido, particularmente muestras a analizar por detección de la fluorescencia emitida. El recipiente de muestra tiene típicamente un volumen menor de 1ml, y puede adoptar la forma de un tubo (es decir un tubo capilar) o de un "capilar plano", en el que el espacio capilar está definido por dos placas separadas o láminas selladas a lo largo de sus bordes. El recipiente de muestra tiene de manera típica una proporción de volumen a área superficial externa de 1 mm aproximadamente, de manera más típica menos de 0,5 aproximadamente. Los tubos capilares que tienen un diámetro interior menor de 1 mm tienen una proporción de volumen respecto al área superficial menor de 0,25 mm. El recipiente utilizado está formado preferentemente a partir de un material ópticamente transparente. Los materiales preferentes son ópticamente transmisibles para luz que tiene una longitud de onda comprendida aproximadamente entre 400 y 800 nm. La utilización de este material permitirá la detección de una señal fluorescente generada en un líquido de muestras mantenido en el recipiente. Además, la utilización de recipientes con una proporción baja de volumen respecto a área superficial para analizar fluorescencia a partir de una muestra fluorescente posibilita una detección más eficaz de la fluorescencia debido a una reflexión interna total.

Los recipientes que tienen una elevada proporción de área superficial respecto al volumen (o inversamente, una relación baja del volumen con respecto al área superficial) pueden ser difíciles de cargar con muestras de líquido. De manera ventajosa, el sistema de manipulación de muestras ayuda a superar estas dificultades. De acuerdo con una realización, un recipiente que tenga una elevada proporción de área superficial respecto a volumen, y un extremo abierto está dotado de una caperuza de embudo que se acopla sobre el extremo abierto del recipiente para facilitar la carga de muestras de líquido en el recipiente. La caperuza en forma de embudo comprende una primera abertura receptora de la muestra y una segunda abertura de transferencia de la muestra así como medios para fijar de manera liberable la caperuza de embudo sobre el recipiente, de manera que la abertura de transferencia de la muestra de la caperuza del embudo y el extremo abierto del recipiente se encuentren alineados. En una realización la caperuza de embudo puede ser una construcción de plástico o de goma y está formada de manera tal que el diámetro interno de la abertura de transferencia de la muestra se acopla por rozamiento en el diámetro externo del recipiente en las proximidades de su extremo abierto. No obstante, se conocen por parte de los técnicos en la materia otros medios para el acoplamiento de la caperuza de embudo al recipiente, incluyendo la utilización de adhesivos, bridas, abrazaderas y similares. En una realización el sistema de manipulación de muestras puede comprender además un tapón para acoplamiento de estanqueización ajustado por fricción con la abertura receptora de muestras de la caperuza de embudo. No obstante, cualquier dispositivo o material que cierre de manera efectiva la abertura del embudo para impedir contaminación o evaporación de la muestra cargada es adecuado para su utilización con la presente invención.

De manera ventajosa los recipientes pueden ser utilizados en un método para favorecer la detección y la eficacia de la captación de fluorescencia en una muestra que comprende un fluoróforo. El método comprende las etapas de colocar una muestra en un recipiente que tiene paredes compuestas por un material ópticamente transparente y definiendo

un volumen que tiene, como mínimo, una primera y segunda dimensiones. La primera dimensión es menor que la segunda dimensión y la proporción de volumen respecto al área superficial externa del recipiente es menor de 1 mm. La detección incrementada y eficacia de captación de fluorescencia generadas por la muestra se consiguen por la detección de fluorescencia a lo largo de un eje substancialmente paralelo a una pared a lo largo de la segunda dimensión del recipiente. En una realización, la fluorescencia de la muestra es inducida por iluminación excitatoria del fluoróforo de la muestra, de manera que ésta es iluminada a lo largo de un eje substancialmente paralelo a una pared a lo largo de la segunda dimensión del recipiente. En una realización preferente, se consigue una eficacia óptima de la captación de fluorescencia por iluminación excitatoria de fluoróforo de la muestra, a lo largo del eje de detección de fluorescencia (detección epifluorescente), y la fluorescencia se detecta a lo largo de un eje a través de una pared del recipiente que tiene la menor área superficial, preferentemente a lo largo de un eje que atraviesa el fondo del recipiente.

En una realización la fluorescencia de la muestra biológica puede ser dependiente de la temperatura. Por ejemplo, un recipiente puede contener una muestra que comprende secuencias de ácido nucleico y la entidad fluorescente puede comprender un colorante específico de doble hileras. Al aumentar la temperatura de la muestra hasta la temperatura de desnaturalización, la intensidad de la fluorescencia disminuye. De manera alternativa, la entidad fluorescente puede comprender un par de sondas de oligonucleótido que hibridizan regiones adyacentes de una secuencia de ácido nucleico objetivo, de manera que una de dichas sondas es etiquetada con un fluoróforo aceptador y la otra sonda es etiquetada con un fluoróforo cedente o donante de un par de transferencias de energía de fluorescencia. En esta realización el recipiente y la muestra pueden ser calentados controlando simultáneamente la fluorescencia de un fluoróforo, como mínimo, del par de transferencia de energía de fluorescencia.

El recipiente adopta la forma de un tubo capilar que puede ser utilizado de manera ventajosa en procedimientos que requieren ciclos térmicos de una muestra, por ejemplo, amplificación de una secuencia de ácido nucleico objetivo por una reacción de cadena de polimerasa. En un ejemplo, el recipiente capilar queda constituido para su inserción en un soporte de muestra de un dispositivo utilizado para ciclos térmicos o un dispositivo utilizado para detectar fluorescencia. El soporte de muestras del dispositivo puede contener solamente un recipiente único, o bien el soporte de muestras puede adoptar forma de un carrusel para mantener una serie de recipientes de muestra.

Un carrusel adecuado para su utilización es el mostrado en las figuras 31A&B. El carrusel (1) adopta, en general, la forma de un disco (2) que tiene una superficie superior (3), una superficie de fondo (4) y un borde externo (5) que se extiende entre ambas. El disco (2) tiene una serie de conjuntos de aberturas receptoras de muestras alineadas radialmente (6A), (6B), y (6C) en la superficie superior (3), una abertura para el recipiente de muestras (7) en el borde externo (5) y un paso para muestras (8) que comunica con las aberturas receptoras de muestras (6A), (6B) y (6C) y la respectiva abertura (7) para el recipiente de muestras. El carrusel (1) se ha mostrado con recipientes de muestras fijos, algunos de los cuales se han indicado con el numeral (9). La abertura (7) del recipiente de muestras y el paso para muestras (8) se han formado para recibir y fijar el recipiente de muestras (9) al disco (2). En una realización, el recipiente de muestras (9) está fijado de forma liberable al carrusel (1) para permitir la retirada del recipiente de muestras y su sustitución con otro recipiente de muestras para permitir la utilización múltiple del carrusel (1). En una realización alternativa, los recipientes de muestras (9) están fijados permanentemente al disco (2), o se han constituido en forma de un componente integral del mismo. En una realización el recipiente de muestras (9) está fijado al disco (2) por contacto y fricción entre el recipiente de muestras (9) y, como mínimo, una parte del paso de muestras (8) próximo a dicha abertura (7) para el recipiente de muestras. También pueden ser utilizados otros medios convencionales para la fijación del recipiente de muestras en comunicación con el recipiente de muestras. Por ejemplo, se pueden formar cabezas de tornillo complementarias sobre la superficie del paso de muestras (8) y en la superficie exterior del recipiente de muestras (9). Además, se pueden utilizar adhesivos o cualquier otro medio de fijación conocido por los técnicos en la materia de acuerdo con la presente invención para fijar el recipiente de muestras (9) al disco (2). Las superficies superior e inferior del carrusel de la presente invención están formadas preferentemente para permitir el apilamiento de múltiples carruseles uno encima de otro, de manera que un apilamiento de múltiples carruseles puede ser acoplado de manera desmontable con un eje de impulsión de un motor y pueden girar simultáneamente como unidad, tal como se ha mostrado en la figura 32.

La realización mostrada en la figura 32 comprende un motor paso a paso (504) y un eje de impulsión (506) que funciona para retener y obligar a girar los carruseles indicados de manera general con el numeral (1). Una cámara de ventilador (508) es utilizada para generar el flujo de aire indicado por las flechas (512). Un dispositivo de calentamiento (510) funciona calentando el aire que pasa por los recipientes de muestras (9). Un conjunto de fluorímetro (514) comprende una fuente de LED (514A), fotodiodos (514B), lentes de enfoque (514C), y un conjunto de filtros (514D). Un motor paso a paso (516) del fluorímetro funciona desplazando el conjunto del fluorímetro (514) en la dirección de la flecha (518). Los técnicos en la materia podrán construir fácilmente las realizaciones según la presente invención, conformadas de acuerdo con la figura 32 utilizando la información que se facilita en esta descripción.

En otra realización (no mostrada) el carrusel comprende un disco que tiene una superficie superior, una superficie inferior, un borde externo que se extiende entre aquéllas, una abertura receptora de la muestra en la superficie superior, una abertura de recipiente de muestras en la superficie inferior y un paso de muestras que comunica con dicha abertura receptora de muestras y la abertura del recipiente de muestras. La abertura del recipiente de muestras y el paso para las muestras están constituidos para recibir y fijar un recipiente de muestras al disco. Preferentemente los recipientes de muestras son retenidos formando un ángulo agudo en disposición radial con respecto a la superficie de fondo del disco.

En una realización el paso de muestras del disco comprende una primera parte que tiene un eje central substancialmente paralelo a las superficies superior y de fondo del disco y una segunda parte que tiene un eje central que forma ángulo agudo con las superficies superior y de fondo del disco. En esta realización, la abertura del recipiente de muestras y el paso para las muestras están constituidos para recibir y fijar un recipiente de muestras al disco de manera tal que el recipiente de muestras se extiende desde el disco formando ángulo agudo con respecto a la superficie de fondo del mismo.

El carrusel (1) está dotado además de medios para cerrar las aberturas receptoras de muestras (6A), (6B) y (6C). Los medios de cierre pueden ser un tapón (no mostrado) que se asienta en la abertura (6) para la recepción de muestras y que se acopla por fricción con las paredes adyacentes del paso de muestras, o, por ejemplo, una cinta con adhesivo en su cara posterior, para aplicación a la superficie superior para sellar de manera efectiva la boca de la abertura receptora de muestras para impedir contaminación o evaporación de la muestra que se ha cargado. El carrusel (1) está acoplado de manera desmontable con un eje de impulsión para su rotación. Cualesquiera medios de acoplamiento adecuados de tipo conocido por los técnicos en la materia pueden ser utilizados incluyendo acoplamiento por fricción, o la utilización de tornillos, pernos, pasadores de bloqueo o abrazaderas. En una realización, el disco (2) está constituido como anillo dotado de un orificio central formado para recibir un eje de impulsión (-506- en la figura 32). El extremo del eje de impulsión está dotado preferentemente de estructuras para retener los discos (2) en su lugar.

El carrusel (1) de la presente invención puede ser utilizado para suministrar una muestra de líquido a un recipiente de muestras (9). En una realización el recipiente de muestras (9) es un recipiente capilar que contiene una mezcla predeterminada (por ejemplo, una mezcla de reactivos) que interacciona con uno o varios componentes de la muestra introducida. De acuerdo con una realización, la mezcla predeterminada es añadida al recipiente de muestras antes de colocar un recipiente de muestras capilar en la abertura de dicho recipiente de muestras. De manera alternativa, el recipiente de muestras es preenvasado con una mezcla predeterminada. La mezcla predeterminada puede comprender reactivos que reaccionan o interaccionan con la muestra para producir una señal detectable o para producir un producto derivado.

El paso para muestras (8) del carrusel (1) está dotado opcionalmente de una o varias barreras (10) que impiden que la muestra de líquido suministrada a través de las aberturas receptoras (6A), (6B) y (6C) de la muestra pueda pasar a la abertura (7) del recipiente de muestras a falta de una fuerza positiva que actúe sobre dicha muestra de líquido. El término “barrera” se utiliza en esta descripción para incluir cualquier estructura que dificulte el flujo libre de una muestra de líquido suministrada a la abertura receptora de muestras hacia la abertura del recipiente de muestras. Se incluyen como ejemplos de barreras adecuadas para su utilización en el paso para muestras del carrusel, unas depresiones o cubetas formadas en el paso de muestras, salientes que estrechan el paso de muestras o nervios anulares que se extienden desde la superficie del paso de muestras, membranas porosas, válvulas direccionales o aletas que son forzadas a la posición de cierre.

Las barreras son formadas de manera tal que la muestra de líquido pueda superar la barrera por la aplicación de una fuerza sobre una muestra de líquido que se encuentre en el paso para las muestras y que está bloqueada por la barrera. La aplicación de una fuerza sobre la muestra se consigue preferentemente por la fuerza centrípeta generada por la rotación del carrusel. Por lo tanto, en un carrusel que tenga una serie de juegos de aberturas receptoras de muestras (6A), (6B) y (6C) en la superficie superior, correspondiendo a cada uno de los juegos con un paso para muestras y una abertura del recipiente de muestras, se pueden añadir muestras individualmente a las diferentes aberturas receptoras de muestras y la barrera localizará la muestra de líquido e impedirá que las muestras pasen a las respectivas aberturas del recipiente de muestras. Después de que la totalidad de muestras han sido suministradas a las aberturas receptoras correspondientes, se hace girar el carrusel para suministrar las muestras a la correspondiente abertura de recipiente de muestras, pasando al recipiente de muestras acoplado.

Según una realización, cada uno de los pasos de muestras del carrusel comunica con una abertura única de recipiente de muestras y una serie de aberturas receptoras de muestras. De acuerdo con esta realización, el paso para las muestras puede incluir opcionalmente un paso central que se ramifica para comunicar con múltiples aberturas receptoras de muestras o de manera alternativa, tal como es mostrado en las figuras 31A&B, múltiples aberturas (6A), (6B) y (6C) receptoras de muestras están alineadas según un eje común que se prolonga radialmente desde el centro del disco, comunicando cada una de dichas aberturas a través de un paso con un recipiente de muestras alojado en la abertura del recipiente de muestras. El paso de las muestras puede quedar dotado de una o varias barreras (9A) que impiden que una muestra añadida a cualquiera de la serie de aberturas receptoras de muestras pueda pasar hacia el recipiente de muestras sin fuerza que actúe sobre dicha muestra de líquido. Además, cada paso de muestras puede quedar dotado de múltiples barreras, cada una de las cuales requiere una magnitud distinta de fuerza para producir la transferencia de una muestra superando la barrera. De acuerdo con esta realización, después del suministro de las muestras a las aberturas receptoras respectivas, se pueden transferir selectivamente las muestras individuales a las aberturas del recipiente de muestras, pasando al recipiente de muestras al controlar la velocidad de rotación del carrusel.

Por ejemplo, una primera muestra puede ser suministrada a una primera abertura receptora de muestras y una segunda muestra puede ser suministrada a una segunda abertura receptora de muestras de manera que la primera y segunda aberturas receptoras de muestras comunican con un paso común y cada una de dichas primera y segunda aberturas receptoras de muestras están dotadas de una barrera que impide el flujo de las correspondientes primera y segunda muestras. Las barreras permiten que el disco quede dispuesto como parte de un juego de elementos o conjunto

con cantidades predeterminadas de reactivos, catalizadores, enzimas, aceites, etc. previamente seleccionados que son cargados previamente en el paso de las muestras mediante una o varias de las aberturas receptoras de muestras.

En una realización la barrera para la segunda abertura receptora de muestras está formada de manera que se debe aplicar una fuerza mayor a la muestra suministrada a la segunda abertura receptora de muestras para pasar su barrera asociada que es requerida para que una muestra suministrada a la primera abertura del receptor de muestras supere su barrera asociada. De acuerdo con esta realización, la rotación del carrusel a una primera velocidad suministra la primera muestra a la abertura del recipiente de muestras, pasando al recipiente de muestras, mientras que la segunda muestra no puede pasar hacia la abertura del recipiente de muestras, entrando en el recipiente de muestras. La rotación a una segunda velocidad incrementada favorecerá entonces la fuerza centrípeta sobre la segunda muestra, con el resultado del suministro de la segunda muestra a la abertura del recipiente de muestras y pasando al recipiente de muestras. Basándose en este principio, se pueden suministrar diferentes muestras a múltiples aberturas de recipientes de muestras que comunican con un paso común y después de haber cargado todas las muestras, las muestras individuales pueden ser suministradas a la abertura del recipiente de muestras y pasando hacia adentro del recipiente de muestras uno a uno o simultáneamente por control de la velocidad de rotación del carrusel. En una realización una primera muestra, que comprende un fluoróforo, es añadida a una primera abertura de recipiente de muestras y una segunda muestra, que comprende un aceite, es suministrada a la segunda abertura de recipiente. El carrusel se hace girar para suministrar la primera muestra al recipiente de muestras seguido del aceite. El aceite (u otro líquido que sella de manera efectiva la primera muestra dentro del recipiente de muestras) funciona reduciendo la evaporación de la primera muestra y reduciendo el riesgo de contaminación de la primera muestra.

En un ejemplo, un carrusel de muestras múltiple es utilizado para manipular múltiples muestras simultáneamente. El carrusel es una estructura en forma de disco que tiene multitud de aberturas receptoras de muestras en la superficie superior de la estructura de disco y que está en comunicación de fluido con correspondientes recipientes de muestras fijados al disco. Las muestras añadidas a las aberturas receptoras de muestras son transferidas a sus correspondientes recipientes de muestras por rotación del carrusel. El carrusel puede tener también múltiples aberturas receptoras de muestras que comunican con cada recipiente de muestras individual. Se pueden colocar reactivos por el usuario en la segunda abertura receptora de muestras que comunica con el recipiente de muestras para suministrar al recipiente otra muestra que fue añadida a la primera abertura receptora de muestras o bien, de modo alternativo, se pueden colocar reactivos predeterminados en una segunda abertura receptora de muestras por el fabricante; es decir, en el caso en el que el carrusel, los recipientes de muestras y el reactivo predeterminado se encuentran en forma preenvasada. Los reactivos, junto con la muestra, son suministrados al recipiente de muestras por rotación del carrusel. Una capa superior de aceite de una muestra acuosa puede ser colocada en una tercera abertura receptora de muestras que se encuentra en comunicación de líquido con el recipiente de muestras (y la primera y segunda aberturas receptoras de muestras), o bien el aceite se puede añadir al carrusel por el fabricante.

De forma alternativa, una muestra, reactivos y aceite para superposición con las muestras se pueden suministrar a una única abertura receptora de muestras. El carrusel puede ser obligado a girar para suministrar cada uno de los compuestos o muestras al respectivo recipiente antes de suministrar una segunda muestra o muestra subsiguiente u otro compuesto a la abertura receptora de muestras.

Un carrusel preferente para recipientes de muestras según la invención comprende tres aberturas receptoras de muestras de modo preferente, pero opcionalmente, dispuestas en alineación radial y en comunicación de fluido con un recipiente de muestras común. De acuerdo con esta realización, alrededor de 1 a 5 μ l de capa superpuesta de aceite, preferentemente con un tinte de color negro, se encuentra presente en forma preenvasada o es suministrado a la abertura receptora de muestras situada radialmente en la parte más interna. La capa de aceite comprende aceite mineral y aproximadamente de 0,01% a 1% de colorante negro orgánico tal como Waxoline® Black OBP de la firma Zenica, Inc. de Wilmington, DE. Aproximadamente de 1 a 9 μ l de una mezcla principal de reactivo se encuentra presente en forma preenvasada o se suministra a la abertura receptora de muestras situada radialmente en la parte más externa. La mezcla principal de reactivo comprende una parte o la totalidad de componentes de reacción necesarios. Una muestra de líquido que contiene el ácido nucleico matriz a comprobar es suministrada manualmente o robóticamente en la abertura receptora de muestras radialmente intermedia. El disco es obligado a girar a continuación a una velocidad tal que transfiere la muestra al compartimiento de reactivos, pero a una velocidad de rotación insuficiente para suministrar la mezcla al recipiente de muestras. La muestra y reactivo pueden ser opcionalmente mezclados por cambios rápidos en la velocidad de rotación del disco. El disco es girado a continuación a una velocidad superior que provoca que la muestra y reactivo, pero no el aceite, se desplacen hacia adentro del recipiente de muestras. El disco es girado a continuación a una velocidad de rotación todavía más elevada para suministrar la capa superpuesta de aceite al recipiente de muestras. El aceite quedará dispuesto como capa superior en la muestra acuosa a causa de su densidad más baja y bloqueará el paso de la luz a causa de su contenido de colorante. La transferencia selectiva de aceite, reactivos y muestra por alteración de la velocidad de rotación del carrusel se consigue por una combinación de: 1) variación del diámetro de los pasos de comunicación del fluido; 2) variación de las dimensiones o tamaño de las barreras físicas presentes en los pasos de comunicación de fluido; y 3) utilizando la dependencia de la fuerza centrífuga en la distancia variable (radio) de cada abertura receptora de muestras desde el centro del disco.

El carrusel de la presente invención puede ser acoplado de manera desmontable con el eje de impulsión y un motor (-506- y -504-, respectivamente en la figura 32) para la rotación del carrusel. Además, carruseles individuales según la presente invención se pueden apilar uno encima de otro y se pueden acoplar con un eje de impulsión para la rotación simultánea (tal como se ha mostrado en la figura 32). Se puede disponer de un dispositivo para controlar

la fluorescencia de una muestra retenida dentro de un recipiente de muestras (ver -514- en la figura 32). El recipiente de muestras comprende un material ópticamente transparente y tiene paredes que definen un volumen que tiene como mínimo una primera y segunda dimensiones, de manera que la primera dimensión es menor que la segunda dimensión y de manera que la relación del volumen respecto al área superficial externa del recipiente es menor de 1 mm. En una
5 realización el dispositivo comprende una cámara, un soporte de recipiente de muestras, una fuente de emisión de luz montada en dicha cámara y dispuesta para iluminar el recipiente de muestras a lo largo de un eje substancialmente paralelo a una pared a lo largo de la segunda dimensión del recipiente y un detector de luz montado en dicha cámara y
dispuesto para medir la fluorescencia desde el recipiente de muestras a lo largo de un eje substancialmente paralelo a una pared según la segunda dimensión del recipiente. La fuente de emisión de luz y el detector de luz de acuerdo con
10 una realización están montados en una plataforma que se puede subir y bajar (tal como se ha indicado por la flecha -518- de la figura 32). En esta realización, la fuente de emisión de luz y el detector de luz se pueden posicionar para medir la fluorescencia desde recipientes de muestras (a lo largo de un eje substancialmente paralelo a una pared según la segunda dimensión del recipiente) de múltiples carruseles cuando los carruseles individuales son apilados uno sobre otro y acoplados con un eje de impulsión para rotación simultánea (ver figura 32).

15 En una realización el soporte del recipiente de muestras comprende un carrusel para soportar una serie de tubos capilares, y el carrusel está montado con capacidad de rotación en dicha cámara. La fuente de emisión de luz está dispuesta para iluminar el tubo capilar a través de la parte inferior del tubo y el detector de luz está montado para detectar fluorescencia a través del fondo del tubo capilar. Además, el dispositivo está dotado de un motor paso a paso
20 para la rotación de dicho carrusel y medios para el acoplamiento del carrusel al motor.

De acuerdo con una realización preferente, la cámara del dispositivo detector de fluorescencia está dotado además de un dispositivo de calentamiento (-510- en la figura 32) y un ventilador (-508- en la figura 32) montados en dicho dispositivo y en comunicación de flujo de aire con la cámara, y un controlador para los mismos, para conseguir ciclos
25 rápidos de temperatura de la cámara utilizando, por lo menos inicialmente, parámetros predeterminados de tiempo y temperatura. El dispositivo es capaz de llevar a cabo reacciones de cadena de polimerasa en los recipientes de muestra retenidos por el carrusel. En particular, el dispositivo permite un método mejorado de realización de reacciones PCR dado que el avance de la reacción se puede controlar en tiempo real, lo cual permite el ajuste de los parámetros de temperatura y tiempo durante el curso de la reacción para optimizar el rendimiento y pureza de la secuencia amplificada
30 del ácido nucleico objetivo.

35 (Apéndice pasa a página siguiente)

40

45

50

55

60

65

SE ADJUNTA A CONTINUACIÓN EL APÉNDICE A DE CÓDIGO DE PROGRAMACIÓN

```

5      320  MS=(DS*10+MS*9)/10:TX=INT(MS+0.5):GOSUB 15
      325  XBY(65508)=TX:GOSUB 50:IF TP>TQ GOTO 340
      330  IF TX<DS*10 GOTO 320
      333  GOSUB 30
      335  GOSUB 50:IF TP<TQ GOTO 335
      340  TU=DTIMEP:ED=TIME
      345  MS=(6*MS+10*(TU-TP))/7:TX=INT(MS+0.5)
10     350  IF TX=0 THEN GOSUB 25:XBY(65508)=TX:XBY(65509)=4
      355  IF TX<0 THEN GOSUB 20:XBY(65508)=0:XBY(65509)=4-TX
      360  IF V=1 THEN IF DTIME<5*(TIME-ES) GOTO 380
      370  IF DTIME<(TIME-ES) GOTO 500
      380  GOSUB 50: GOTO 345

15     500  PRINT "A",XBY(65508)=0:TU=ATIMEP
      845  $(0)="upl 200;gol nd;hfl 2;wfo =x...;sl":GOSUB 3:
      855  XBY(65509)=AS*10
      860  GOSUB 30
      890  ES=TIME:MS=-AS*10
      913  MS=(4*MS+20*(TU-TP))/9:TX=INT(MS+0.5)
      915  IF TX=0 THEN GOSUB 25:XBY(65508)=TX:XBY(65509)=4
20     918  IF TX<0 THEN GOSUB 20:XBY(65508)=0:XBY(65509)=4-TX
      920  IF ATIME<1*(TIME-ES) GOTO 925
      924  XSUB 50: GOTO 913

      925  PRINT:PRINT "B",XBY(65509)=4:TU=ATIMEP+1
      930  $(0)="hfl 1;upl 50;gol;wfo =x...;sl":GOSUB 3:MS=0: REM CLOSE
      935  MS=(ES*10+MS*9)/10:TX=INT(MS+0.5):GOSUB 15:GOSUB 25:XBY(65508)=TX
25     937  GOSUB 50:IF TP>TQ GOTO 970
      940  IF TX<ES*10 GOTO 935
      950  GOSUB 50: IF TP<TQ-1 GOTO 950
      970  ED=TIME
      980  MS=(MS+5*(TU-TP))/2:TX=INT(MS+0.5)
      983  IF TX=0 THEN GOSUB 25:XBY(65508)=TX:XBY(65509)=4
30     987  IF TX<0 THEN GOSUB 20:XBY(65508)=0:XBY(65509)=4-TX
      990  IF EDIM<(TIME-ES) GOTO 1000
      995  GOSUB 50: GOTO 980
1000  CTIME=TIME-IME: TMC=TIME: PRINT "CYCLE=",V,"TIME=",CTIME
1050  NEXT V

35     1055  XBY(65508)=0:XBY(65509)=255
      1060  INPUT "STRAND REANNHEALING (Y/N) ?",$ (1)
      1070  IF ASC($ (1),1)=78 GOTO 1290
      1100  PRINT "STRAND REANNHEALING IN PROCESS..."
      1110  TU=DTIMEP:XBY(65509)=4
      1120  MS=(DS*10+MS*9)/10:TX=INT(MS+0.5):GOSUB 15
      1130  XBY(65508)=TX:GOSUB 50:IF TP>TQ GOTO 1170
40     1140  IF TX<DS*10 GOTO 1120
      1150  GOSUB 30
      1160  GOSUB 50:IF TP<TQ GOTO 1160
      1170  ES=TIME
      1180  MS=(11*MS+10*(TU-TP))/12:TX=INT(MS+0.5)
      1185  IF TX=0 THEN GOSUB 25:XBY(65508)=TX:XBY(65509)=4
      1190  IF TX<0 THEN GOSUB 20:XBY(65508)=0:XBY(65509)=4-TX
45     1193  IF 5<(TIME-ES) GOTO 1200
      1196  GOSUB 50: GOTO 1180
      1200  XBY(65508)=0:XBY(65509)=255:MS=0
      1210  DO:GOSUB 50:UNTIL TP<75

50     1220  ES=TIME
      1230  MS=(MS+5*(75-TP))/3:TX=INT(MS+0.5)
      1240  IF TX=0 THEN GOSUB 25:XBY(65508)=TX:XBY(65509)=4
      1250  IF TX<0 THEN GOSUB 20:XBY(65508)=0:XBY(65509)=4-TX

```

ES 2 304 573 T3

```

NEW
1  GOTO 60:REM ***I/O stepper (I=$ (0), O=z(72))***
3  IF (XBY(65507).AND.64)=0 THEN Z(0)=XBY(65506) : GOTO 3
4  DO : WHILE (XBY(65507).AND.128)=128
5  I=0 : DO : I=I+1 : XBY(65506)=ASC($ (0),I)
6  WHILE ASC(6(0),I)<>13 : RETURN
7  DO : WHILE (XBY(65507).AND.64)=64
8  I=0 : DO : Z(I)=XBY(65506)
9  I=I+1 : UNTIL Z(I-1)=32 : RETURN

10 REM ***error check***
15 IF TX<0 THEN TX=0
16 RETURN
20 IF TX<-251 THEN TX=-251
21 RETURN
25 IF TX>251 THEN TX=251
26 RETURN

15 30 GOSUB 50:TP1=TP:T1=TIME
32 DO:UNTIL TIME>T1+0.2
34 GOSUB 50:TP2=TP:T2=TIME
36 SL=(TP2-TP1)/(T2-T1):IF SL<0 THEN IT=(T2-TP2)/SL
38 PRINT USING(###.##), "SL=",SL, "IT=",IT, "AT TEMP=",TP1
40 IF IT>1 GOTO 30
42 RETURN

49 REM ***temperature measurement***
50 E=XBY(65504):F=XBY(65505):G=XBY(65506):TP=(F*256+G+100)/38.3: RETURN

60 CLEAR : STRING 150,72 : DIM Z(72)
72 DTEMP=95:DTIM=1:DS=10
74 ATEMP=60:ATIM=1:AS=20
76 ETEMP=74:ETIM=15:ES=1:CYCLE=100
80 PRINT USING(##), " ",TAB (20),"TEMP",TAB (30),"TIME",TAB (40),"SLOPE"
82 PRINT "1) DENATURATION", TAB(20),DTEMP,TAB(30),DTIM,TAB(40),DS
84 PRINT "2) ANNEALING", TAB(20),ATEMP,TAB(30),ATIM,TAB(40),AS
86 PRINT "3) EXTENSION", TAB(20),ETEMP,TAB(30),ETIM,TAB(40),ES
30 88 PRINT "4) CYCLES", CYCLE:PRINT
110 INPUT "TYPE # TO CHANGE OR 0 IF OK (CHOICES ARE 0,1,2,3, OR 4)?:J
114 IF J=0 THEN GOTO 170
116 ON J GOSUB ,120,130,150,160
118 PRINT:GOTO 80
120 INPUT "ENTER DENATURATION Temp, Time, Slope: ",DTEMP,DTIM,DS
35 125 IF DTEMP>98 GOTO 120
126 RETURN
130 INPUT "ENTER ANNEALING Temp, Time, Slope: ",ATEMP,ATIM,AS
140 IF AS<0 GOTO 130
142 IF AS>21 GOTO 130
145 RETURN
40 150 INPUT "ENTER EXTENSION Temp, Time, Slope: ",ETEMP,ETIM,ES:RETURN
160 INPUT "ENTER Number of Cycles:",CYCLE:RETURN
170 $(0)="mrx1 500;sp1 200;hf1 2;rt2 1;exr": GOSUB 3 : GOSUB 7
178 FOR I=0 TO 10 : PRINT CHR(Z(I)), : NEXT I : PRINT

200 $(0)="gol nd;hf1 2;wfo =.x...;sl":GOSUB 3: rem open
210 PRINT "WAIT FOR COOLING":XBY(65504)=3
220 DO : GOSUB 50 : UNTIL TP<45
230 PRINT "TEMP=",TP, " LOAD SAMPLES AND THEN PRESS A KEY"
240 W=GET : IF W=0 GOTO 240

300 TMC=0:WS=0: CLOCK 0 : TIME=0 : DBY(71)=0 : CLOCK 1
305 $(0)="hf1 1;sp1 100;gol;wfo =x...;sl":GOSUB 3: REM CLOSE
310 FOR V=1 TO CYCLE
50 315 PRINT "D", : TG=UTEMP:XBY(65509)=4:IF V=1 THEN TG=UTEMP+(DS/4)

1280 XBY(65508)=0:XBY(65509)=255
1290 INPUT "ANOTHER RUN (Y/N) ?":$(1)
1300 IF ASC($ (1),1)=78 GOTO 2000
1400 PRINT:$(0)="gol nd;hf1 9;wfo =.x...;sl":GOSUB 3:GOTO 80
2000 $(0)="gol nd;hf1 9;wfo =.x...;sl":GOSUB 3:END

```

ES 2 304 573 T3

SE ADJUNTA A CONTINUACIÓN EL APÉNDICE B DE CÓDIGO DE PROGRAMACIÓN

Archivo hex del procedasor de temperatura (IC 2) (Temp24a.hex):

```
:03000000020033C8
:05000B00C0D002312508
:05001300C0D00230D74F
:05002300C0D00232BA5A
:05002B00C0D0023042CC
:20003300C2AFC2D4C2D3752100752200752300D215D28AAF81758130858115C0D0C0F0C098
:20005300E0C08753C6FB1230897527405388CF5389F012317D78FC12305D12324912365439
:20007300C20EC20FC208759850D2ACD2AF8587D0B0D000D001D0D030E20530E4028012
206A
:20009300E602800DBF070280089038A974FA02373975C7AA75C755438740907471C082C03F
:2000B3008378187A00C000C0029037A6C082C083D003D001D005D004D002D00012309590D6
:2000D3007084C082C08378007A00D083D082E8F0907060C082C08378007A00D083D082E8C1
:2000F300F0A3EAF002013BD281D29090705CC2D57400C4C0A8C2AFC282C2907908C282
A28C
:2001130081339280D282D9F5F5F07904C282A28133D282D9F7C282D290D0A8F0E5F0C454C9
:200133000FA3F030D501222202015BD2A3C2A122D2A3D2A122C2A3D2A122C2A222D2A
22248
:20015300D2A022C2A022222212015612014812015012015A907055C082C08378017A00D0FF
:2001730083D082E8F078007A001230D278007A0012319D123216A8887A00C000C00278F7F2
:200193007A00C000C002D003D001D002D00012322D8888A8887A00C000C00278407A00C06B
:2001B3000C002D003D001D002D000123231888890232FA882AA83123235D217907471127D
:2001D30033931233D8123416D297907087C082C08378007A00D083D082E8F0122328122357
:2001F3002890705AC082C08390705CE0F8A3E0FAD083D082E8F0A3EAF01225FF907087
E09D
:20021300F87A00C000C00278007A00C000C002D003D001D002D00012342FB84A6003020110
:20023300F112232812015312014390707EC082C08378007A00D083D082E8F0A3EAF09070B2
:200253007CC082C08378007A00D083D082E8F0A3EAF0907088C082C08378017A00D083D07B
:2002730082E8F078007A001230D2907074C082C08378017A00D083D082E8F0A3EAF0907025
:2002930062C082C083907060B0F8A3E0FAD083D082E8F0A3EAF0907060C082C08390708947
:2002B300C082C083907074E0F8A3E0FAC000C00278087A00C000C002D003D001D002D00099
:2002D30012348EC000C002C000C00278E87A03C000C002D003D001D002D000123508B84A0D
:2002F30070030230C278017A00C000C002D003D001D002D0001234CF000C002D003D0018E
:20031300D002D00012350EC000C002D003D00189828B83123528D083D082E8F0A3EAF0909B
:200333007080C082C083907089C082C083907074E0F8A3E0FAC000C00278087A00C000C062
:200353002D003D001D002D0001234CF000C00278017A00C000C002D003D001D002D000F0
```

ES 2 304 573 T3

```

:2003730012350EC000C002C000C00278E87A03C000C002D003D001D002D000123508E84AEB
:2003930070030230C278017A00C000C002D003D001D002D0001234CFC000C002D003D001ED
:2003B300D002D00012350EC000C002D003D00189828B83123528C000C00278D27A00C0007F
:2003D300C002D003D001D002D0001234CFC000C002907089C082C083907074E0F8A3E0FA94
:2003F300C000C00278087A00C000C002D003D001D002D0001234CFC000C00278027A00C05B
:200413000C002D003D001D002D00012350EC000C002C000C00278E87A03C000C002D00336
:20043300D001D002D000123508E84A70030230C278017A00C000C002D003D001D002D00093
:200453001234CFC000C002D003D001D002D00012350EC000C002D003D00189828B831235D1
:2004730028C000C002D003D001D002D00012350ED083D082E8F0A3BAF0907085C082C08320
:20049300907089C082C083907074E0F8A3E0FAC000C00278087A00C000C002D003D001D000
:2004B30002D00012348EC000C00278037A00C000C002D003D001D002D000123512C000C06B
:2004D30002C000C00278E87A03C000C002D003D001D002D000123508E84A70030230C27880
:2004F300017A00C000C002D003D001D002D0001234CFC000C002D003D001D002D000123582
:200513000EC000C002D003D00189828B83123528D083D082E8F0907089C082C0839070740D
:20053300E0F8A3E0FAC000C00278087A00C000C002D003D001D002D00012348EC000C002B9
:2005530078057A00C000C002D003D001D002D000123512C000C002C000C00278E87A03C0CF
:2005730000C002D003D001D002D000123508E84A70030230C278017A00C000C002D003D060
:2005930001D002D0001234CFC000C002D003D001D002D00012350EC000C002D003D00189C4
:2005B300828B83123528C000C00278C87A00C000C002D003D001D002D00012352DE84A700F
:2005D300030205DA020A16907068C082C083907088E0F87A00C000C00278017A00C000C046
:2005F30002D003D001D002D000123512D083D082E8F0A3EAF0907068C082C083907068E018
:20061300F8A3E0FAC000C002907089C082C083907074E0F8A3E0FAC000C00278087A00C
0BD
:2006330000C002D003D001D002D00012348EC000C00278047A00C000C002D003D001D0025B
:20065300D000123512C000C002C000C00278E87A03C000C002D003D001D002D00012350866
:20067300E84A70030230C278017A00C000C002D003D001D002D0001234CFC000C002D003A9
:20069300D001D002D00012350EC000C002D003D00189828B83123528C000C002D003D001AB
:2006B300D002D000123537D083D082E8F0A3EAF0907068E0F8A3E0FAC000C00278007A
0QDC
:2006D300C000C002D003D001D002D00012352DE84A7003020A16907052C082C083907089A4
:2006F300C082C083907074E0F8A3E0FAC000C00278087A00C000C002D003D001D002D00055
:200713001234CFC000C00278057A00C000C002D003D001D002D00012350EC000C002C000D9
:20073300C00278E87A03C000C002D003D001D002D000123508E84A70030230C278017A0064
:20075300C000C002D003D001D002D0001234CFC000C002D003D001D002D00012350EC00
0CC
:20077300C002D003D00189828B83123528D083D082E8F0A3EAF0907068E0F8A3E0FAC00009
:20079300C002907052E0F8A3E0FAC000C002D003D001D002D00012354DE84A70030207CA09

```

ES 2 304 573 T3

```

:2007B300907014C082C08378FF7AFFD083D082E8F0A3EAF00207DE907014C082C083780
1AA
:2007D3007A00D083D082E8F0A3EAF0907012C082C083907089C082C083907074E0FPE58A3E
:2007F300FAC000C00278087A00C000C002D003D001D002D0001Z348EC000C00278067A005A
:20081300C000C002D003D001D002D000123512C000C002C000C00278E87A03C000C002D071
:200833003D001D002D000123508E84A70030230C278017A00C000C002D003D001D002D08C
:2008530001234CFC000C002D003D001D002D00012350EC000C002D003D00189828B831202
:200873003528D083D082E8F0A3EAF0907012C082C083907012E0F8A3E0FAC000C00290708E
:2008930014E0F8A3E0FAC000C002D003D001D002D00012348ED083D082E8F0A3EAF090
7046
:2008B30068C082C083907068E0F8A3E0FAC000C002907012E0F8A3E0FAC000C002D003
D06D
:2008D30001D002D00012348ED083D082E8F0A3EAF0907068C082C083907068E0F8A3E0F
AEA
:2008F300C000C002907060E0F8A3E0FAC000C002D003D001D002D000123512D083D082E800
:20091300F0A3EAF0907068E0F8A3E0FAC000C00278007A00C000C002D003D001D002D0
005E
:20093300123553E84A7003020951907068C082C08378007A00D083D082E8F0A3EAF0907030
:2009530014E0F8A3E0FAC000C00278017A00C000C002D003D001D002D00012342F84A7
0C7
:2009730030209BC907068E0F8A3E0FAC000C002907052E0F8A3E0FAC000C002D003D0018E
:20099300D002D00012354DE84A70030209B9907068C082C083907052E0F8A3E0FAD083D0EE
:2009B30082E8F0A3EAF00209FE907068E0F8A3E0FAC000C002907052E0F8A3E0FAC000
CODE
:2009D30002D003D001D002D000123508E84A70030209FE907068C082C083907052E0F8A305
:2009F300E0FAD083D082E8F0A3EAF0907060C082C083907068E0F8A3E0FAD083D082E8
F0F1
:200A1300A3EAF0907060C082C083907060E0F8A3E0FAC000C00278207A00C000C002D00
3C3
:200A3300D001D002D00012348ED083D082E8F0A3EAF0907082C082C08378017A00D083
D045
:200A530082E8F0907062E0F8A3E0FAC000C002907060E0F8A3E0FAC000C002D003D001
D045
:200A730002D00012342FC000C00290705CE0F8A3E0FAC000C002907060E0F8A3E0FAC0
00F2
:200A9300C002D003D001D002D000123537123559C000C00278207A00C000C002D003D00163
:200AB300D002D000123568C000C002D003D001D002D00012356EE84A7003020AE190708241

```

ES 2 304 573 T3

:200AD300C082C08378007A00D083D082E8F0907057C012C083907089C082C083907074E0D1
:200AF300F8A3E0FAC000C00278087A00C000C002D001D001D002D00012348EC000C002
785C
:200B1300077A00C000C002D003D001D002D000123512C000C002C000C00278E87A03C0007F
:200B3300C002D003D001D002D000123508E84A70030230C278017A00C000C002D003D00199
:200B5300D002D0001234CFC000C002D003D001D002D00012350EC000C002D003D001898
27D
:200B73008B83123528D083D082E8F0120DEP121231907074C082C083907074E0F8A3E0FA43
:200B9300C000C00278017A00C000C002D003D001D002D000123512D083D082E8F0A3EA
F0B2
:200B8300907074E0F8A3E0FAC000C002907089C082C08378027A00C000C002C000C0027859
:200B8D300E87A03C000C002D003D001D002D000123508E84A70030230C278017A00C000C07A
:200BF30002D003D001D002D0001234CFC000C002D003D001D002D00012350EC000C002
D016
:200C130003D00189828B83123528C000C002D003D001D002D00012352DC000C00290708720
:200C3300E0F87A00C000C00278007A00C000C002D003D001D002D00012342FC000C002D003D001E9
:200C530003D001D002D000123575E84A7003020291907088C082C083907088E0F87A00C06E
:200C73000C00278017A00C000C002D003D001D002D0001235127A00D083D082E8F0907094
:200C930088E0F87A00C000C002907089C082C08378007A00C000C002C000C00278E87A0304
:200CB300C000C002D003D001D002D000123508E84A70030230C278017A00C000C002D00329
:200CD300D001D002D0001234CFC000C002D003D001D002D00012350EC000C002D003D0
0136
:200CF30089828B83123528C000C002D003D001D002D00012357CC000C002907087E0F87A73
:200D13000CC000C00278007A00C000C002D003D001D002D00012342FC000C002D003D001E9
:200D3300D002D000123575E84A700302027D120150907087C082C08378007A00D083D08216
:200D5300E8F0D21778FF7A00E81233A41233D812341678007A0012319D1225PF12318FC0EA
:200D73000C00278E7A02C000C002D003D001D002D00012354DC000C002907087E0F87A05
:200D93000CC000C00278017A00C000C002D003D001D002D00012342FC000C002D003D00168
:200DB300D002D000123575E84A700302026C907087E0F87A00C000C00278017A00C000C0D4
:200DD30002D003D001D002D00012342FE84A60030202341201481201560201DD907085E06D
:200DF300F87A00C000C00278007A00C000C002D003D001D002D00012352DC000C00290703C
:200E130085E0F87A00C000C002780A7A00C000C002D003D001D002D000123553C000C00286
:200E3300D003D001D002D00012356EE84A7003020E6D907054C082C08378017A00D083D093
:200E530082E8F090700CC082C08378047A00D083D082E8F0A3EAF0020E92907054C082C0AC
:200E73008378007A00D083D082E8F090700CC082C08378087A00D083D082E8F0A3EAF09058
:200E93007080E0F8A3E0FAC000C00278007A00C000C002D003D001D002D00012354DE84
AF8

ES 2 304 573 T3

```

:200EB3007003020ECC90700CC082C083780C7A00D083D082E8F0A3EAF0122328907085E085
:200ED300F87A00C000C00778007A00C000C002D003D001D002D00012342FE84A7003020F26
:200EF30005907085C082C08378C87A00D083D082E8F090705EC082C08390705CE0F8A3E0FF
:200F1300PAD083D082E8F0A3EAF090705CE0F8A3E0FAC000C002907060E0F8A3E0FAC
00022
:200F3300C002D003D001D002D00012352DE84A7003020FC0907068C082C08390705CE0F88B
:200F5300A3E0FAC000C002907060E0F8A3E0FAC000C002D003D001D002D000123537D0
8331
:200F7300D082E8F0A3EAF090706AC082C08378FF7AFFD083D082E8F0A3EAF0907068E
0F89E
:200F9300A3E0FAC000C00278407A00C000C002D003D001D002D00012352DE84A7003020
F1B
:200FB300BA12013E020FBD120143020FD790706AC082C08378017A00D083D082E8F0A3E
A1B
:200FD300F0120143907057E0F87A00C000C00278037A00C000C002D003D001D002D00012B8E
:200FF300342FE84A7003021038907085C082C08378C87A00D083D082E8F0907072C082C0D7
:201013008378017A00D083D082E8F0A3EAF090700CC082C08378087A00D083D082E8F0A
3A2
:20103300EAF0021230907060E0F8A3E0FAC000C00278007A00C000C002D003D001D002
D084
:201053000012352DE84A700302112C907060E0F8A3E0FAC000C00278807A00C000C002D01E
:201073003D001D002D00012352DE84A70030210D890706AE0F8A3E0FAC000C00278017AB0
:2010930000C000C002D003D001D002D00012342FE84A70030210K1907072C082C083780217
:2010B3007A00D083D082E8F0A3EAF00210D5907072C082C083780E7A00D083D082E8F0
A3AB
:2010D300EAF002112990706AE0F8A3E0FAC000C00278017A00C000C002D003D001D002
D0EB
:2010F3000012342FE84A7003021115907072C082C08378067A00D083D082E8F0A3EAF002B0
:201113001129907072C082C083780C7A00D083D082E8F0A3EAF00211F7907060E0F8A3E0CE
:20113300FAC000C00278807A07C000C002D003D001D002D00012352DE84A70030211A6907D
:20115300706AE0F8A3E0FAC000C00278017A00C000C002D003D001D002D00012342FE84
A69
:20117300700302118F907072C082C083780A7A00D083D082E8F0A3EAF00211A3907072C072
:2011930082C08378027A00D083D082E8F0A3EAF00211F790706AE0F8A3E0FAC000C0027
8C6
:2011B300017A00C000C002D003D001D002D00012342FE84A70030211E3907072C082C083D2
:2011D300780A7A00D083D082E8F0A3EAF00211F7907072C082C08378017A00D083D082E885

```

ES 2 304 573 T3

```

:2011F300F0A3EAF0907085E0F87A00C000C002780A7A00C000C002D003D001D002D000
1240
:201213003553E84A7003021230907072C082C08378017A00D083D082E8F0A3EAF022907044
:2012330054E0F87A00C000C00278017A00C000C002D003D001D002D00012342FE84A70039E
:2012530002125912013E907057E0F87A00C000C00278027A00C000C002D003D001D002D006
:2012730000123582E84A70030212811225F4907057E0F87A00C000C00278037A00C000C08D
:2012930002D003D001D002D00012342FE84A70030212CF907062C082C08390705CE0F8A338
:2012B300E0FAD083D082E8F0A3EAF0907056C082C08378017A00D083D082E8F0D21790
374C
:2012D300B5123588907088E0F87A00C000C00278207A00C000C002D003D001D002D000122F
:2012F3003512E81233A4907074E0F8A3E0FAC000C00278207A00C000C002D003D001D0026E
:20131300D000123512E81233A41233D8123416907082E0F87A00C000C00278017A00C0003E
:20133300C002D003D001D002D00012342FE84A700302149412189A122328907068C082C043
:2013530083907060E0F8A3E0FAC000C00290705CE0F8A3E0FAC000C002D003D001D002
D047
:2013730000123537D083D082E8F0A3EAF090706AE0F8A3E0FAC000C00278FF7AFFC000
C031
:2013930002D003D001D002D00012342FE84A70030213D5907068C082C083907068E0F8A31E
:2013B300E0FAC000C00278FF7AFFC000C002D003D001D002D00012348ED083D082E8F0
A312
:2013D300EAF0907068E0F8A3E0FAC000C00290700CE0F8A3E0FAC000C002D003D001D
00288
:2013F300D00012352DC000C002907087E0F87A00C000C00278017A00C000C002D003D001A0
:20141300D002D00012342FC000C002D003D001D002D00012356EC000C00290707E0F8A
3AA
:20143300E0FAC000C00278007A00C000C002D003D001D002D000123596C000C002D003D081
:2014530001D002D00012356EC000C00290707CE0F8A3E0FAC000C00278007A00C000C002D8
:20147300D003D001D002D000123596C000C002D003D001D002D00012356EE84A600302130F
:2014930047120150907054E0F87A00C000C00278017A00C000C002D003D001D002D000129A
:2014B300342FE84A70030214BF120143907072C082C08378017A00D083D082E8F0A3EAF002
:2014D300907085C082C08378007A00D083D082E8F0907054C082C08378007A00D083D08210
:2014F300E8F090706AC082C08378017A00D083D082E8F0A3EAF0907080E0F8A3E0FAC0
0090
:20151300C00278007A00C000C002D003D001D002D00012354DE84A70030215FD78007A00FD
:201533001230D278007A0012319D12232812189A12359CC000C002907080E0F8A3E0FAC097
:2015530000C002D003D001D002D000123508C000C002907087E0F87A00C000C00278017A51
:2015730000C000C002D003D001D002D000123596C000C002D003D001D002D00012356EC076

```

ES 2 304 573 T3

```

:201593000C00290707E0F8A3E0FAC000C00278007A00C000C002D003D001D002D0001235
:2015B3003596C000C002D003D001D002D00012356EC000C00290707CE0F8A3E0FAC000C
0FD
:2015D3000278007A00C000C002D003D001D002D000123596C000C002D003D001D002D00097
:2015F30012356EE84A600302153D907057E0F87A00C000C00278007A00C000C002D003D0F8
:2016130001D002D00012352DC000C00290707E0F8A3E0FAC000C00278007A00C000C00255
:20163300D003D001D002D000123596C000C002D003D001D002D00012356EC000C002907075
:2016530087E0F87A00C000C00278017A00C000C002D003D001D002D00012342FC000C0026A
:20167300D003D001D002D00012356EE84A7003021863907057E0F87A00C000C00278027A1B
:201693000C000C002D003D001D002D00012342FC000C002907057E0F87A00C000C00278D5
:2016B300037A00C000C002D003D001D002D00012342FC000C002907056E0F87A00C000C0B3
:2016D3000278017A00C000C002D003D001D002D00012342FC000C002D003D001D002D00
0FD
:2016F30012356EC000C002D003D001D002D000123575E84A70030217C0907057C082C08344
:2017130078017A00D083D082E8F012232812189A907087E0F87A00C000C00278017A00C017
:201733000C002D003D001D002D00012342FC000C00290707E0F8A3E0FAC000C0027800CA
:201753007A00C000C002D003D001D002D000123596C000C002D003D001D002D00012356
EDA
:20177300C000C00290707CE0F8A3E0FAC000C00278007A00C000C002D003D001D002D00
0C7
:20179300123596C000C002D003D001D002D00012356EE84A600302171D90707C082C08310
:2017B30078007A00D083D082E8F0A3EAF0907057C083C08378017A00D083D082E8F01225A7
:2017D300F412232812189A907087E0F87A00C000C00278017A00C000C002D003D001D0029B
:2017F300D00012342FC000C00290707E0F8A3E0FAC000C00278007A00C000C002D003D
0A3
:2018130001D002D000123596C000C002D003D001D002D00012356EC000C00290707CE0F8E2
:20183300A3E0FAC000C00278007A00C000C002D003D001D002D000123596C000C002D00
3AA
:20185300D001D002D00012356EE84A60030217D490707EC082C08378007A00D083D082E849
:20187300F0A3EAF090707C082C08378007A00D083D082E8F0A3EAF078007A001230D27
87D
:20189300007A0012319D22907057E0F87A00C000C00278037A00C000C002D003D001D002A1
:2018B300D00012342FE84A7003021993907068C082C083907062E0F8A3E0FAC000C00290C7
:2018D300705CE0F8A3E0FAC000C002D003D001D002D000123537D083D082E8F0A3BAF
09004
:2018F3007068C082C083907068E0F8A3E0FAC000C00290706AE0F8A3E0FAC000C002D00325

```

ES 2 304 573 T3

:20191300D001D002D00012348ED083D082E8F0A3EAF0907068E0F8A3E0FAC000C00278
01BB
:201933007A00C000C002D003D001D002D000123553C000C002907056E0F87A00C000C0020C
:2019530078007A00C000C002D003D001D002D00012342FC000C002D003D001D002D000126B
:20197300356EE84A7003021990907056C082C08378017A00D083D082E8F01225F4021CBA13
:20199300907085E0F87A00C000C00278007A00C000C002D003D001D002D00012342FC000EC
:2019B300C002907085E0F87A00C000C00278C87A00C000C002D003D001D002D00012342F02
:2019D300C000C002D003D001D002D000123575E84A7003021A04907062C082C08390706064
:2019F300E0F8A3E0FAD083D082E8F0A3BAF0021CBA907058C082C08312359CC000C002
90DB
:201A13007085E0F87A00C000C002D003D001D002D0001234CF000C00278207A00C000C07B
:201A330002D003D001D002D0001234CF083D082E8F0A3EAF0907058C082C083907058E027
:201A5300F8A3E0FAC000C002780A7A00C000C002D003D001D002D0001231AAD083D08
2E83E
:201A7300F0A3EAF0907068C082C083907058E0F8A3E0FAD083D082E8F0A3EAF0907058
C03A
:201A930082C08312318FC000C00278647A00C000C002D003D001D002D00012350EC000C027
:201AB3000278197A00C000C002D003D001D002D0001231AAC000C002907085E0F87A00C038
:201AD30000C002D003D001D002D0001234CF000C00278087A00C000C002D003D001D0
0262
:201AF300D0001234CF000C00278647A00C000C002D003D001D002D0001231AAD083D0
828C
:201B1300E8F0A3EAF0907068C082C083907068E0F8A3E0FAC000C002907058E0F8A3E0F
A84
:201B3300C000C002D003D001D002D00012350ED083D082E8F0A3EAF0907068E0F8A3E0
FABE
:201B5300C000C00278007A10C000C002D003D001D002D00012352DE84A7003021B8590706B
:201B730068C082C08378007A10D083D082E8F0A3EAF0907068C082C083907068E0F8A3E0B9
:201B9300FAC000C00290706AE0F8A3E0FAC000C002D003D001D002D00012348ED083D0
82B6
:201BB300E8F0A3EAF0907062C082C083907068E0F8A3E0FAC000C00290705EE0F8A3E0
FAE4
:201BD300C000C002D003D001D002D000123512D083D082E8F0A3EAF090706AE0F8A3E0
FA18
:201BF300C000C00278017A00C000C002D003D001D002D00012342FE84A7003021C679070F6
:201C130062E0F8A3E0FAC000C002907060E0F8A3E0FAC000C002D003D001D002D00012
35B4

ES 2 304 573 T3

:201C33002DE84A7003021C64907062C082C083907060E0F8A3E0FAD083D082E8F0A3EA
F0A7
:201C5300907085C082C08378C87A00D083D082E8F0021CBA907062E0F8A3E0FAC000C0
021F
:201C7300907060E0F8A3E0FAC000C002D003D001D002D000123553E84A7003021CBA907
08D
:201C930062C082C083907060E0F8A3E0FAD083D082E8F0A3EAF0907085C082C08378C87
AD7
:201CB3000D083D082E8F0907016C082C083907084E0F87A00C000C002C000C002781E7A0F
:201CD30000C000C002D003D001D002D000123508E84A70030230C278027A00C000C002D0FB
:201CF30003D001D002D0001234CF000C002D003D001D002D00012350EC000C00290705C4B
:201DI300E0F8A3E0FAC000C00290705AE0F8A3E0FAC000C003D003D001D002D000123
537E4
:201D3300D083D082E8F0A3EAF0907070C082C08378007A00D083D082E8F0A3EAF09070
763F
:201D5300C082C08378007A00D083D082E8F0A3EAF090700AC082C08378137A00D083D0
82C6
:201D7300E8F0A3EAF0907008C082C08378017A00D083D082E8F0A3EAF0907070C082C0
838C
:201D9300907070E0F8A3E0FAC000C002907016C082C083907076E0F8A3E0FAC000C002C041
:201DB30000C002781E7A00C000C002D003D001D002D000123508E84A70030230C278027A9A
:201DD30000C000C002D003D001D002D0001234CF000C002D003D001D002D00012350E
C036
:201DF30000C002D003D00189828B831235A5C000C002D003D001D002D000123512D083D021
:201E130082E8F0A3EAF0907076C082C083907076E0F8A3E0FAC000C002907008E0F8A3E
02D
:201E3300FAC000C002D003D001D002D000123512D083D082E8F0A3EAF0907076E0F8A3
E0A9
:201E5300FAC000C00290700AE0F8A3E0FAC000C002D003D001D002D0009070081235AB
E8EA
:201E73004A6003021D8C907070C082C083907070E0F8A3E0FAC000C002907072E0F8A3E0EE
:201E9300FAC000C002D003D001D002D00012348EC000C00278027A00C000C002D003D00
1FD
:201EB300D002D0001235B7D083D082E8F0A3EAF0907080E0F8A3E0FAC000C00278007A
002C
:201ED300C000C002D003D001D002D000123596E84A7003021F18907070C082C08390707007

ES 2 304 573 T3

:2016F300E0F8A3E0FAC000C00278027A00C000C002D003D001D002D0001235B7D083D0
8299
:201F1300E8F0A3EAF0907054E0F87A00C000C00278017A00C000C002D003D001D002D00076
:201F330012342FC000C002907085E0F87A00C000C00278007A00C000C002D003D001D00254
:201F5300D00012342FC000C00212359CC000C00278017A00C000C002D003D001D002D00087
:201F730012354DC000C002D003D001D002D00012356EC000C002D003D001D002D00012352E
:201F930075E84A700302225B907054E0F87A00C000C00278017A00C000C002D003D001D084
:201FB30002D00012342FE84A7003021FEB907010C082C08378147A00D083D082E8F0A3EA71
:201FD300F090700EC082C08378F67AFFD083D082E8F0A3EAF0022013907010C082C0837848
:201FF300287A00D083D082E8F0A3EAF090700EC082C08378D87AFFD083D082E8F0A3E
AF0DC
:2020130090706CC082C083907062E0F8A3E0FAC000C00290705CE0F8A3E0FAC000C002
D080
:2020330003D001D002D000123537D083D082E8F0A3EAF0907068C082C08390705CE0F8A
3DB
:20205300E0FAC000C002907070E0F8A3E0FAC000C002D003D001D002D000123512C000C
0AB
:2020730002907062E0F8A3E0FAC000C002D003D001D002D000123537C000C00278027A00D8
:20209300C000C002D003D001D002D0001235B7D083D082E8F0A3EAF090706CC082C0839
0EC
:2020B300706CE0F8A3E0FAC000C002907068E0F8A3E0FAC000C002D003D001D002D000
12C3
:2020D3003537D083D082E8F0A3EAF090706CE0F8A3E0FAC000C002907010E0F8A3E0F
AC01F
:2020F30000C002D003D001D002D00012352DE84A700302212090706CC082C083907010E088
:20211300F8A3E0FAD083D082E8F0A3EAF090706CE0F8A3E0FAC000C00290700EE0F8A
3E091
:20213300FAC000C002D003D001D002D000123553E84A700302216290706CC082C083907015
:202153000EE0F8A3E0FAD083D082E8F0A3EAF090706CE082C083907062E0F8A3E0FAC
000A5
:20217300C00278117A00C000C002D003D001D002D0001235B7C000C00278467A00C000C087
:2021930002D003D001D002D000123537C000C00290706CE0F8A3E0FAC000C002D003D00
1FD
:2021B300D002D000123512D083D082E8F0A3EAF0907083C082C08378007A00D083D082E890
:2021D300F0907083C082C083907083E0F87A00C000C00278017A00C000C002D003D001D0B4
:2021F3002D0001235127A00D083D082E8F0907083E0F87A00C000C00290706EE0F8A3E08A
:20221300FAC000C002D003D001D002D000123568E84A700302223012014D02223312015027

ES 2 304 573 T3

:20223300907083E0F87A00C000C00278C87A00C000C002D003D001D002D000123582E84AB7
:2022530070030221D40222A990705CE0F8A3E0FAC000C002907070E0F8A3E0FAC000C00
2BA
:20227300D003D001D002D000123512C000C002907063E0F8A3E0FAC000C002D003D001D
07D
:2022930002D000123568E84A70030222A612014D0222A91201501225FF90705AC082C08396
:2022B30090705CE0F8A3E0FAD083D082E8F0A3EAF0907084C082C083907084E0F87A00
C0C1
:2022D3000C00278017A00C000C002D003D001D002D0001235127A00D083D082E8F090701E
:2022F30084E0F87A00C000C00278137A00C000C002D003D001D002D00012352DE84A70038D
:20231300022327907084C082C08378007A00D083D082E8F0221200FA1200FA22907087E023
:20233300F87A00C000C00278017A00C000C002D003D001D002D00012342FE84A700302259A
:20235300F1907057E0F87A00C000C00278017A00C000C002D003D001D002D00012342FE836
:202373004A700302239090707CC082C08378017A00D083D082E8F0A3EAF0225F19070577B
:20239300E0F87A00C000C00278027A00C000C002D003D001D002D00012342FE84A7003027B
:2023B30023B81225F4907057E0F87A00C000C00278037A00C000C002D003D001D002D0001C
:2023D30012342FE84A70030225F1907056C082C08378007A00D083D082E8F0907064C082C8
:2023F300C083907089C082C083907074E0F8A3E0FAC000C0027807A00C000C002D003D00F
:2024130001D002D00012348EC000C00278037A00C000C002D003D001D002D000123512C0DA
:202433000C002C000C00278E87A03C000C002D003D001D002D000123508E84A700302307A
:20245300C278017A00C000C002D003D001D002D0001234CF000C002D003D001D002D00
00F
:2024730012350EC000C002D003D00189828B83123528C000C00278207A00C000C002D0035D
:20249300D001D002D00012348EC000C002780A7A00C000C002D003D001D002D0001235B79E
:2024B300D083D082E8F0A3EAF0907064C082C083907064E0F8A3E0FAC000C00290706A
E0A1
:2024D300F8A3E0FAC000C002D003D001D002D00012348ED083D082E8F0A3EAF0907062
C08C
:2024F30082C083907062E0F8A3E0FAC000C002907064E0F8A3E0FAC000C002D003D001
D01C
:2025130002D000123512D083D082E8F0A3EAF090706AE0F8A3E0FAC000C00278017A00
C08F
:202533000C002D003D001D002D00012342FE84A700302259E907062E0F8A3E0FAC000C06A
:2025530002907060E0F8A3E0FAC000C002D003D001D002D00012352DE84A700302259B907E
:202573007062C082C083907060E0F8A3E0FAD083D082E8F0A3EAF0907057C082C0837801ED
:202593007A00D083D082E8F00225F1907062E0F8A3E0FAC000C002907060E0F8A3E0FAC
06B

ES 2 304 573 T3

:2025B30000C002D003D001D002D000123553E84A70030225F1907062C082C083907060E082
:2025D300F8A3E0FAD083D082E8F0A3EAF0907057C082C08378017A00D083D082E8F002
35F6
:2025F300EFC29775F005D5F0FD29722907086C082C08312361A750200D083D082E8F090D8
:202613007086E0F87A00C000C0027807A00C000C002D003D001D002D00012342FE84A7004
:2026330003022D1E907068C082C08378007A00D083D082E8F0A3EAF090707AC082C08378E7
:20265300007A00D083D082E8F0A3EAF0907006C082C08378077A00D083D082E8F0A3EAF075
:20267300907004C082C08378017A00D083D082E8F0A3EAF0907086C082C08312361A7502ED
:2026930000D083D082E8F0907086E0F87A00C000C00278007A00C000C002D003D001D00266
:2026B300D00012366CE84A7003022687907068C082C083907068E0F8A3E0FAC000C0029073
:2026D3007086E0F87A00C000C002D003D001D002D000123512D083D082E8F0A3EAF090
7084
:2026F30089C082C08390707AE0F8A3E0FAC000C002C000C00278E87A03C000C002D003
D0E4
:2027130001D002D000123508E84A70030230C278017A00C000C002D003D001D002D000124E
:2027330034CFC000C002D003D001D002D00012350EC000C002907086E0F87A00C000C0028A
:2027530078207A00C000C002D003D001D002D0001235377A00D083D082E8F090707AC0825B
:20277300C08390707AE0F8A3E0FAC000C002907004E0F8A3E0FAC000C002D003D001D0
0261
:20279300D000123512D083D082E8F0A3EAF090707AE0F8A3E0FAC000C002907006E0F8
A331
:2027B300E0FAC000C002D003D001D002D0009070041235ABE84A6003022687907066C08282
:2027D300C083907068E0F8A3E0FAC000C00278D27A00C000C002D003D001D002D00012
3591
:2027F300B7D083D082E8F0A3EAF0907066C082C083907066E0F8A3E0FAC000C00278D2
7A29
:2028130000C000C002D003D001D002D00012348ED083D082E8F0A3EAF0907068C082C08322
:20283300907068E0F8A3E0FAC000C002907066E0F8A3E0FAC000C002D003D001D002D0
00C3
:20285300123537D083D082E8F0A3EAF0907086C082C08312361A750200D083D082E8F090FC
:202873007086E0F87A00C000C00278007A00C000C002D003D001D002D00012366CE84A706B
:202893000302285F907086C082C083907086E0F87A00C000C00278207A00C000C002D003CD
:2028B300D001D002D0001235377A00D083D082E8F0907086E0F87A00C000C002907068E07B
:2028D300F8A3E0FAC000C002D003D001D002D00012366CE84A70030228FB02179037B7
12B1
:2028F30035881233D8123416907068E0F8A3E0FAC000C002907086E0F87A00C000C002D026

ES 2 304 573 T3

:2029130003D001D002D00012342FE84A7003022637D2179037B91235881233D81234169074
:202933007078C082C08378017A00D083D082E8F0A3EAF0907068C082C08378007A00D083F8
:20295300D082E8F0A3EAF090707AC082C08378007A00D083D082E8F0A3EAF0907002C0
828E
:20297300C08378077A00D083D082E8F0A3EAF0907000C082C08378017A00D083D082E8F019
:20299300A3EAF0907086C082C08312361A750200D083D082E8F0907086E0F87A00C000C0BE
:2029B3000278007A00C000C002D003D001D002D00012366CE84A7003022996907068C08284
:2029D300C083907068E0F8A3E0FAC000C002907086E0F87A00C000C002D003D001D002
D0C2
:2029F30000123512D083D082E8F0A3EAF0907089C082C083907078E0F8A3E0FAC000C00214
:202A130078087A00C000C002D003D001D002D00012348EC000C00290707A0E0F8A3E0FA
C0FC
:202A330000C002D003D001D002D000123512C000C002C000C00278E87A03C000C002D003EC
:202A5300D001D002D000123508E84A70030230C278017A00C000C002D003D001D002D0004D
:202A73001234CF000C002D003D001D002D00012350EC000C002907086E0F87A00C000C037
:202A93000278207A00C000C002D003D001D002D0001235377A00D083D082E8F090707AC098
:202AB30082C08390707A0E0F8A3E0FAC000C002907000E0F8A3E01AC000C002D003D001
D0A2
:202AD30002D000123512D083D082E8F0A3EAF090707A0E0F8A3E0FAC000C002907002E0
F893
:202AF300A3E0FAC000C002D003D001D002D0009070001235ABE84A6003022996907066C010
:202B130082C083907068E0F8A3E0FAC000C00278D27A00C000C002D003D001D002D0001200
:202B330035B7D083D082E8F0A3EAF0907066C082C083907066E0F8A3E0FAC000C00278
D22A
:202B53007A00C000C002D003D001D002D00012348E1D0831X082E8F0A3EAF0907068C082
C0E8
:202B730083907068E0F8A3E0FAC000C002907066E0F8A3E01AC000C002D003D001D002
D0FD
:202B930000123537D083D082E8F0A3EAF0907086C082C08312361A750200D083D082E8F049
:202BB300907086E0F87A00C000C00278007A00C000C002D003D001D002D00012366CE84A08
:202BD3007003022BA0907086C082C083907086E0F87A00C000C00278207A00C000C002D009
:202BF30003D001D002D0001235377A00D083D082E8F0907068E0F8A3E0FAC000C002907098
:202C130086E0F87A00C000C002D003D001D002D00012342FE84A7003022C6ED2179037BBE0
:202C33001235881233D8123416907078C082C083907078E0F8A3E0FAC000C00278017A00FA
:202C5300C000C002D003D001D002D000123512D083D082E8F0A3EAF0022C7CD2179037
BD2F
:202C73001235881233D8123416907078E0F8A3E0FAC000C002907089C082C08378027A00A8

ES 2 304 573 T3

:202C9300C000C002C000C00278E87A03C000C002D003D001D002D000123508E84A70030282
:202CB30030C278017A00C000C002D003D001D002D0001234CF000C002D003D001D002
D077
:202CD3000012350EC000C002D003D00189828B83123528C000C002D003D001D002D0001204
:202CF300352DE84A7003022946907087C082C08378017A00D083D082E8F0907086C082C045
:202D13008378007A00D083D082E8F0907086E0F87A00C000C00278097A00C000C002D00304
:202D3300D001D002D00012342FE84A7003022D5790707EC082C08378017A00D083D082E8EA
:202D5300F0A3EAF0907086E0F87A00C000C002780A7A00C000C002D003D001D002D000
12C3
:202D7300342FE84A7003022DDF907087C082C083907087E0F87A00C000C00278017A00C010
:202D930000C002D003D001D002D0001235127A00D083D082E8F0907087E0F87A00C000C06F
:202DB3000278017A00C000C002D003D001D002D00012352DE84A7003022DDF907087C08253
:202DD300C08378007A00D083D082E8F0907086E0F87A00C000C002780B7A00C000C002D085
:202DF30003D001D002D00012342FE84A7003022E15907086C082C08378007A00D083D08249
:202E1300E8F0907086E0F87A00C000C002780C7A00C000C002D003D001D002D00012342F32
:202E3300E84A7003022F03907086C082C08312361A750200D083D082E8F0907086E0F87A6D
:202E53000C000C00278007A00C000C002D003D001D002D00012366CE84A7003022E3A90D0
:202E73007086C082C083907086E0F87A00C000C00278207A00C000C002D003D001D002D090
:202E9300001235377A00D083D082E8F0907087E0F87A00C000C00278007A00C000C002D00B
:202EB30003D001D002D00012342FE84A7003022EF2907086E0F87A00C000C00278017A0000
:202ED300C000C002D003D001D002D00012342FE84A7003022EEF120153022EF2120156905D
:202EF3007086C082C08378007A00D083D082E8F0907086E0F87A00C000C002780D7A00C0BC
:202F13000C002D003D001D002D00012342FE84A7003022FF7907086C082C08312361A7572
:202F33000200D083D082E8F0907086E0F87A00C000C0027807A00C000C002D003D001D00BD
:202F530002D00012366CE84A7003022F28907087E0F87A00C000C00278007A00C000C0020B
:202F7300D003D001D002D00012342FE84A7003022FE6907055C082C083907086E0F87A0015
:202F9300C000C00278207A00C000C002D003D001D002D0001235377A00D083D082E8F090BD
:202FB3007055E0F87A00C000C00278007A00C000C002D003D001D002D00012342FE84A7094
:202FD3003022FDD120159022FE612015A120148120156907086C082C08378007A00D083C9
:202FF300D082E8F0907086E0F87A00C000C002780E7A00C000C002D003D001D002D0001260
:20301300342FE84A700302302D907086C082C08378007A00D083D082E8F0907086C082C034
:203033008378007A00D083D082E8F0220236728587E020E5FAD0D0D0E0D0E0D2D574AA
759A
:20305300F055900033C082C0833253883F53892F438920438780888D758800D28E2275C770
:20307300AA75C755D2BF2212307175C7AA75C755438704D21D2275C7AA75C7555387FB
C238
:203093001D2289828B83E493C082C08388828A83F06017DC09E4F0158115810230CA3A81F

ES 2 304 573 T3

:2030B30082AA83D083D082A380DC15811581229037B74460237399037D374500237398852
:2030D300298A2A2230191C301705D21AD0D0222008FDC082C08390748BC2D5D21BC21A
C026
:2030F300D0800ED0D032C082C083907489D2D5C0D0C0E0C0FDC000C001C002C003C004
C06A
:2031130005C006C007D215E0F8A3E0F583850082E473301052C0E085278CE52804B4C808F3
:20313300E40529B52902052AF52830113820133520120EE528B52A07E52CB5290280025064
:203153002420171F20081CE5C620E217D0E0D213C212C211C082C083903173C082C083322E
:203173000230FDD212D0E0D0D032E4F529F52AF528F52CF52BC211C212C213228528E07588
:20319300F005A485E00085F002227501057503001231AA85002822C3E94B7005D30232065D
:2031B300227F007E007C007D0075F0101231EFEE33FEEF33FFC3EF9B40117005C3EB994060
:2031D3000AC3EE99FEEF9BFFD38001C31231F7D5F0DA8C008D078F038E01C322C3EB3
3F81A
:2031F300BA33FA22EC33FCED33FD229037F374140237399037E4740A023739903810742866
:203213000237395389F0D21043A882D28C22907489E8F0A3EAF043A88222E859F822E84991
:20323300F82290748B8E8F0A3EAF0D219D2BCC2BAD2B943A884229074F87475F0A37400
F090
:203253009074F67475F0A37400F0751000751101C208C21722C2ACC082C083F89074F6605B
:20327300F9A3E0F5828983E8F0A3E582B45003907500A882E5829074F7F088828983A3E534
:2032930082B45003907500A8829074F8A3E0B50008D2AC0000C2AC80F4200804D208D29956
:2032B300D083D082D2AC22209846C299300E03023390C0E0C082C083C000C001C002C0032C
:2032D3009074F7E0FA9074F8E0F9A3E0FB850205C208023382850382850183E0F599A3E56D
:2032F30082B45003907500E5829074F9F0023382C0E0E599C29820150302338E84030620D2
:203313000F030233EEB41304D20E806FB41109300E69D299C20E8063C082C083C000C00132
:20333300C002C003FA90749FE0F890749DAB829074A0E0F9A3E0F5828983A3E582B503036A
:2033530090748DEAF0E583A9829074A0F0E9A3F0B5001C90749EE0F583882A3E582B503B5
:203373000390748DE583A98290749EF0E9A3F0D003D002D001D000D083D082D0E0D0D0
3298
:20339300E060061233A4A380F72008FD222008FD221233AB123268227911B42000400207DE
:2033B30022B40D03770122B408021722B40A07D0E0D0E00233DD22C000C0E0123268D0E06E
:2033D300D000D8F322740D1233A4740A123268E5106005F8E41233CA22C2AF9033F6C082B6
:2033F300C08332C3721B721A5008903405C082C083323008033099FD851581301D04C2APB3
:2034130080FE222008FDC21712341F22301A0C90342EC082C083C0D00230D722123435026F
:203433003462C2D5EB33EA123459903441738012D3222200EACBFAE8C9F812347620D5017A
:20345300B3221234762233333C3540622B2D5A2D58008B3B0D58003B372D5400302348595
:20347300023489C2D5EAB50308C2D5EBB50102D2D522E4F8FA2278FF7AFP22EB33EA12
3481

ES 2 304 573 T3

:2034930059C0E090349A73800F802780031234F61234FFEA5B33401F1234CFEA30E70A33BB
:2034B300487014D0E030D01122D0E030D0031234F6221234F680E115810231FEC3E889F0B1
:2034D300A4FCADF0E960088AF0A420D2122DFDEB600688F0A420D2072D4004FAA804
22D38D
:2034F3000231FEE4C398F8E49AFAC322E4C399F9E49BFBC322123476023467D2D58002C218
:20351300D5C3E829F8EA3BFA10D504A2D2C2D250030231FE22EDF87A0022123435023466B6
:20353300D2D58002C2D5C3E899F8BA9BFA10D504A2D2C2D250030231FE221234760234
660E
:20355300123435023467EA30E70A1234F6EA30E70302320E2212343502346CE859F8EA5BF6
:20357300FA22E849F8EA4BFA2212347C02346612343502346BE49360061233A4A380F62029
:2035930008FD22123476023462E52AA829B52AF9FA22EDF8A3EDFA22C3A3E033400302355F
:2035B30068023582EB33EA1234599035C17380118013801E1234F61234FF1231AA1234FFC2
:2035D300221231AA221234F61231AA1234F61234FF221234FF1231AA1234F622D007D0069E
:2035F300D005D004D003D002D001D000D0F0D0E0D0D020D509D083D082D0D0C21B32
D08314
:20361300D082D0D0C21322C0A853A8EB9074A1E0F890749DA88290749EE0F9A3E0B500
045E
:203633007800801A8983F82A3E582B5030390748DE0F8AB82E58390749EF0EBA3F0D0A897
:203653002290748DAA83A98290749EBAF0A3E9F09074A0EAF0A3E9F022123476023460C224
:20367300111233A080FE7433C3301B02940EF5F0E581B51500400C747FF42581400525F022
:2036930040012285158102369C9038717464023739C082C0831233D890389712358812362A
:2036B300BFD083D0821235881233D82290389E12358890755B1235A5907551A982AB831243
:2036D30036E29075511233939038A512358822C3E84A7006C0E07C01800E7C00790A1237D5
:2036F30007C0010CE84A70F47930D0E029F0A3DCF9E4F022AF02AE00AB0178077902BF
8BEE
:20371300F084AA F0FF18E6D7C48BF084AA F0C4C6C4D7C48BF084AA F0D6A806AA07A
9F022E5
:20373300E8F0A3EAF022B42800500122C0E0C000C002C0E0C082C0839075591235A590751A
:203753005B123733D083D082D0E0B4280040061236A42008FDD002D000D0E090755D F0B49F
:20377300500122B42800500122B4960122301B0B301A0890378EC082C08332C2AF80FEC2A2
:20379300AF301B0B301A089037A2C082C08332C2AF80FE5045533A54454D5020322E34356F
:2037B300610061004200470047004200417272617920496E64657820546F6F204269670087
:2037D300537472696E67205472756E636174656400446976696465206279205A65726F0085
:2037F3004D617468204F766572666C6F77004D61746820556E646572666C6F77004D617436
:203813006820417267756D656E742042616400496E7075742056616C756520546F6F2042C2
:20383300696700496E7075742056616C7565204572726F7200496E7075742056616C756521
:20385300204E656761746976650049737461636B2F42353220436F6E666C696374004973BD

ES 2 304 573 T3

:203873007461636B204572726F7200566563746F722072656C6F636174696F6E20464149B3
:203893004C4544004552524F522000284C696E652000293A2000535441525455502F52454A
:0438B3005345540025
:00003301CC

Archivo hex procesador de paso a paso (IP 3) (Paso23.hex):

:03000000020033C8
:05000B00C0D0021EB68A
:05001300C0D0021EB68D0
:05002300C0D0021FDF48
:05002B00C0D0021C3CE6
:20003300C2AFC2D4C2D3752100752200752300D215D28AAF81758130858115C0D0C0F0C098
:20005300E0C08753C6FB121C837527405388CF5389F0121F0E78FC121C57121F6E1221AC99
:20007300C20EC20FC208759850D2ACD2AFE587D0E0D000D001D0D030E20530E4028012
206A
:20009300E602800DBF0702800890245374FA0222E475C7AA75C75543B740907058C082C030
:2000B3008378177A00C000C002902351C082C083D003D001D005D1X4D002D000121C8F905A
:2000D3007024C082C08378197A00C000C002C000C002781A7A00C000C002D003D001D002E1
:2000F300D000121CCCE84A7003021CBC78027A00C000C002D001D001D002D000121D00
C0F9
:2001130000C002D003D001D002D000121D3FC000C00278547A3DC000C002D002D000D0
83DA
:20013300D082E8F0A3EAF0907009C082C083783C7A00D083D082E8F002068D907004C082F1
:20015300C08378007A00D083D082E8F0907010E0F8A3E0FAC000C00278807A3EC000C002C1
:20017300D003D001D002D000121D59E84A70030201B4907010C082C083907010E0F8A3E042
:20019300FAC000C00278807A3EC000C002D003D001D002D000121D8ED083D082E8F0A3
BA91
:2001B300F0907010E0F8A3E0FAC000C00278007A00C000C002D003D001D002D000121D
A4C8
:2001D300E84A7003020209907010C082C083907010E0F8A3E0FAC000C00278807A3EC0006E
:2001F300C002D003D001D002D000121D43D083D082E8F0A3EAF0907010E0F8A3E0FAC
00053
:20021300C00278407A1FC000C002D003D001D002D000121D59E84A7003020272907004C089
:2002330082C08378017A00D083D082E8F0120631907010C082C08378807A3EC000C00290D6

ES 2 304 573 T3

:200253007010E0F8A3E0FAC000C002D003D001D002D000121D8ED083D082E8F0A3EAF
090A7
5 :200273007012C082C083907010E0F8A3E0FAC000C00290700EE0F8A3E0FAC000C002D003C5
:20029300D001D002D000121DAAD083D082E8F0A3EAF090700CC082C08390700CE0F8A
3E00D
10 :2002B300FAC000C002907012E0F8A3E0FAC000C002D003D001D002D000121D43D083D0
8269
:2002D300E8F0A3EAF090700CE0F8A3E0FAC000C00278807A3EC000C002D003D001D00
2D05B
15 :2002F3000121DFDE84A700302032D90700CC082C08390700CE0F8A3E0FAC000C00278807C
:200313007A3EC000C002D003D001D002D000121D8ED083D082E8F0A3EAF0907010E0F8
A308
20 :20033300E0FAC000C00278017A00C000C002D003D001D002D000121D59E84A70030205D
28D
:20035300907015E0F87A00C000C00278017A00C000C002D003D001D002D000121DA4E84AE1
:200373007003020389907015C082C08378017A00D083D082E8F0907015E0F87A00C000C078
25 :200393002780B7A00C000C002D003D001D002D000121D59E84A70030203BF907015C0823B
:2003B300C083780B7A00D083D082E8F090701EC082C083907010E0F8A3E0FAC000C002786B
:2003D300027A00C000C002D003D001D002D000121E03D083D082E8F0A3EAF090701EE0
F8A3
30 :2003F300A3E0FAC000C002907015E0F87A00C000C002D003D001D002D000121E57E84A7093
:200413000302042E90701EC082C083907015E0F87A00D083D082E8F0A3EAF090701CC08230
:20043300C08378017A00D083D082E8F0A3EAF090701AC082C08378157A00D083D082E8F056
35 :20045300A3EAF0907012C082C083907010E0F8A3E0FAC000C00290701EE0F8A3E0FAC0
005B
:20047300C00290701CE0F8A3E0FAC000C002D003D001D002D000121D00C000C00278027
AC9
40 :2004930000C000C002D003D001D002D000121D00C000C002D003D001D002D000121D8A
D001
:2004B30083D082E8F0A3EAF0907020C082C083907012E0F8A3E0FAC000C00278C87A00
C0F7
45 :2004D30000C002D003D001D002D000121E03D083D082E8F0A3EAF0907022C082C083907
02D
:2004F30012E0F8A3E0FAC000C00278C87A00C000C002907020E0F8A3E0FAC000C002D0
50 03PA
:20051300D001D002D000121D00C000C002D003D001D002D000121D8AD083D082E8F0A3
EA9B

ES 2 304 573 T3

:20053300F0907022E0FE907020E0FF90701EE0F890701CE0FF90701AE0FA74FF88F0C0F03F
:200553009A89F0C0F0D2A0F5F0D5F0FDC2A0F5F0D5F0FDD0F0D5F0EBD0F0D5F0E1F
BEF248F
:2005730001FFDF0302059475F0C8C0F0D2A08BF0D5F0FDC2A08BF0D5F0FDD0F0D5F0
EBDP71
:20059300E6EE2401FEDE030205ADD2A08BF0D5F0FDC2A08BF0D5F0FDD0F0E888F0C
0F02A63
:2005B30089F0C0F0D2A0F5F0D5F0FDC2A0F5F0D5F0FDD0F0D5F0EBD0F0D5F0E10206
089067
:2005D3007010E0F8A3E0FAC000C00278017A00C000C002D003D001D002D000121E5DE8
4A37
:2005F3007003020608D2A075F0FFD5F0FDC2A075F0FFD5F0FDD0907004E0F87A00C000C0
026D
:2006130078017A00C000C002D003D001D002D000121E5DE84A700302063012063122907037
:200633000E0F8A3E0FAC000C00278FF7AFRC000C002D003D001D002D000121E5DE84
A70DB
:200653000302067090700EC082C08378017A00D083D082E8F0A3EAF0D2A202068690700E7C
:20067300C082C08378FF7AFD083D082E8F0A3EAF0C2A222D2A122C2A12278007A0012
1E36
:200693006378007A00121F2B121F3BA8887A00C000C00278F77A00C000C002D003D001D01C
:2006B30002D000121F528888A8887A00C000C00278407A00C000C002D003D001D002D0009C
:2006D300121F5688889019BAA882AA83121F5AD297C2A3D2A2C2A4C2A1D21790705812
20AD
:2006F300B81220FD12213B90700EC082C08378017A00C000C002D002D000D083D082E8F06B
:20071300A3EAF0907016C082C08378007A00D083D082E8F0907008C082C08378007A00D0F0
:2007330083D082E8F0907018C082C08378007A00D083D082E8F0907019C082C08378197A44
:2007530000D083D082E8F078007A00121E6378007A00121F2E121F20C000C00278FA7A0074
:20077300C000C002D003D001D002D000121E57E84A700302078C121AFE120C9E907016E001
:20079300F87A00C000C00278017A00C000C002D003D001D002D000121E5DE84A700302075C
:2007B30068907018E0F87A00C000C00278017A00C000C002D003D001D002D000121D59E8A7
:2007D3004A7003020B2590700AC082C08378017A00D083D082E8F0A3EAF0907002C082C097
:2007F30083907018E0F87A00D083D082E8F0A3EAF0907000C082C08378017A00D083D082E2
:20081300E8F0A3EAF090700AE0F8A3E0FAC000C002907019E0F87A00C000C002D003D0
01PE
:20083300D002D000122154E84A700302096E907010C082C083907024C082C08390700AE036
:20085300F8A3E0FAC000C002C000C002781A7A00C000C002D003D001D002D000121CCC
E856

ES 2 304 573 T3

```

:200873004A7003021C8C78027A00C00C002D003D001D002D000121D00C000C002D003D
0BE
:2008930001D002D000121D3FC000C002D003D00189828B8312215AC000C002907024C08280
:2008B300C083907019E0F87A00C000C002C000C002781A7A00C000C002D003D001D002D09F
:2008D30000121CCCE84A7003021C8C78027A00C000C002D003D001D002D000121D00C0
0BE1
:2008F300C002D003D001D002D000121D3FC000C002D003D00189828B8312215AC000C00221
:20091300D003D001D002D000121D8AD083D082E8F0A3EAF0907010C082C083907010E0
F84E
:20093300A3E0FAC000C00290700E0F8A3E0FAC000C002D003D001D002D000121DAAD
0834E
:20095300D082E8F0A3EAF0907015C082C083780A7A00D083D082E8F012014E907019C0820E
:20097300C08390700AE0F8A3E0FA7A00D083D082E8F0121A2090700AC082C08390700AE006
:20099300F8A3E0FAC000C002907000E0F8A3E0FAC000C002D003D001D002D000121D43
D0EE
:2009B30083D082E8F0A3EAF090700AE0F8A3E0FAC000C002907002E0F8A3E0FAC000C
00240
:2009D300D003D001D002D000907000122160E84A6003020818907010C082C083907024C0FB
:2009F30082C08378017A00C000C002C000C002781A7A00C000C002D003D001D002D0001242
:200A13001CCCE84A7003021C8C78027A00C000C002D003D001D002D000121D00C000C0
02EF
:200A3300D003D001D002D000121D3FC000C002D003D00189828B8312215AC000C0029070A1
:200A530024C082C083907019E0F87A00C000C002C000C002781A7A00C000C002D003D00139
:200A7300D002D000121CCCE84A7003021C8C78027A00C000C002D003D001D002D00012
1D5D
:200A930000C000C002D003D001D002D000121D3FC000C002D003D00189828B8312215AC081
:200AB30000C002D003D001D002D000121D8AD083D082E8F0A3EAF0907010C082C08390
70D3
:200AD30010E0F8A3E0FAC000C00290700E0F8A3E0FAC000C002D003D001D002D0001
21DC2
:200AF300AAD083D082E8F0A3EAF0907015C082C083780A7A00D083D082E8F012014E90
70CB
:200B130019C082C08378017A00D083D082E8F0020C87907019E0F87A00C000C00278017A3F
:200B330000C000C002D003D001D002D000122154E84A7003020C73907010C082C083907098
:200B530024C082C08378017A00C000C002C000C002781A7A00C000C002D003D001D002D00E
:200B730000121CCCE84A7003021C8C78027A00C000C002D003D001D002D000121D00C0
003E

```

ES 2 304 573 T3

```
:200B9300C002D003D001D002D000121D3FC000C002D003D00189828B8312215AC000C0027E
:200BB300907024C082C083907019E0F87A00C000C002C000C002781A7A00C000C002D003A9
:200BD300D001D002D000121CCC84A7003021C8C78027A00C000C002D003D001D002D
0005A
:200BF300121D00C000C002D003D001D002D000121D3FC000C002D003D00189828B8312210B
:200C13005AC000C002D003D001D002D000121D8AD083D082E8F0A3EAF0907010C082C
08357
:200C3300907010E0F8A3E0FAC000C00290700EE0F8A3E0FAC000C002D003D001D002D0
008F
:200C5300121DAAD083D082E8F0A3EAF0907015C082C083780A7A00D083D082E8F01201
4E3A
:200C7300907019C082C08378017A00D083D082E8F0121A20907016C082C08378007A00D0AA
:200C930083D082E8F0121AF302075A907017C082C083122172750200D083D082E8F09070DD
:200CB30017E0F87A00C000C00278097A00C000C002D003D001D002D000121E5DE84A700341
:200CD300021834120687907008C082C08378007A00D083D082E8F090700EE0F8A3E0FAC0F5
:200CF30000C00278FF7AFPC000C002D003D001D002D000121E5DE84A7003020D1312063
ICA
:200D130090700CC082C08378007A00D083D082E8F0A3EAF0907015C082C08378057A00D0E2
:200D330083D082E8F0907005C082C08378007A00D083D082E8F0907017C082C083122172B9
:200D5300750200D083D082E8F0907017E0F87A00C000C00278007A00C000C002D003D00189
:200D7300D002D000122154E84A7003020D49907017E0F87A00C000C00278527A00C000C08B
:200D930002D003D001D002D000121E5DE84A7003020DA9120631907017E0F87A00C000C
0DC
:200DB3000278507A00C000C002D003D001D002D000121E5DE84A7003020DE5907010C0829C
:200DD300C08378017A00D083D082E8F0A3EAF012014E9107017E0F87A00C000C00278447
A4E
:200DF30000C000C002D003D001D002D000121E5DE84A7003020E58907010C082C083780A67
:200E13007A00D083D082E8F0A3EAF012014E90700CE0F8A3E0FAC000C002786B7A3EC
000AC
:200E3300C002D003D001D002D000121D59E84A7003020E58907005C082C08378017A00D0B5
:200E530083D082E8F0907017E0F87A00C000C00278467A00C000C002D003D001D002D000E7
:200E7300121E5DE84A7003020ECB907010C082C08378147A00D083D082E8F0A3EAF0120
1AA
:200E93004E90700CE0F8A3E0FAC000C002786B7A3EC000C002D003D001D002D000121D
5923
:200EB300E84A7003020ECB907005C082C08378017A00D083D082E8F0907017E0F87A00C07C
```

ES 2 304 573 T3

:200ED30000C00278477A00C000C002D003D001D002D000121E5DC000C002907005E0F87
AD6
:200EF30000C000C00278007A00C000C002D003D001D002D000122154C000C002D003D001F6
:200F1300D002D0001221D2E84A7003020D49907005E0F87A00C000C00278007A00C000C0CF
:200F33002D003D001D002D000121E5DE84A700302181590700EE0F8A3E0FAC000C0027898
:200F5300017A00C000C002D003D001D002D000121B5DE84A7003020F6F120631907017C069
:200F730082C083122172750200D083D082E8F0907017E0F87A00C000C00278007A00C00063
:200F9300C002D003D001D002D000122154E84A7003020F6F907017C082C083907017E0F8FF
:200FB3007A00C000C00278207A00C000C002D003D001D002D000121D8E7A00D083D082
B884
:200FD300F0907010C082C08378967A00C000C002907017E0F87A00C000C002D003D001D010
:200FF30002D000121D8ED083D082E8F0A3EAF0907015C082C083780A7A00D083D082E8
F042
:2010130012014E907024C082C08378017A00C000C002C000C002781A7A00C000C002D0035B
:20103300D001D002D000121CCCE84A7003021C8C78027A00C000C002D003D001D002D0
00F5
:20105300121D00C000C002D003D001D002D000121D3FC000C00278007A00D083D082E8F027
:20107300A3EAF0907007C082C08378017A00D083D082E8F0907010C082C08378367A05D052
:2010930083D082E8F0A3EAF0907015C082C083780A7A00D083D082E8F012014E90700CC0D3
:2010B30082C08378CA7AFAD083D082E8F0A3EAF0120631907017C082C083122172750200A7
:2010D300D083D082E8F0907017E0F87A00C000C00278007A00C000C002D003D001D002D
0DB
:2010F30000122154E84A70030210C6907017E0F87A00C000C002784E7A00C000C002D00359
:20111300D001D002D000121E5DE84A7003021178907007C082C083907007E0F87A00C000E7
:20113300C00278017A00C000C002D003D001D002D000121D437A00D083D082E8F0907010A6
:20115300C082C083789B7A02D083D082E8F0A3EAF0907015C082C083780A7A00D083D08233
:20117300E8F012014E907017E0F87A00C000C00278477A00C000C002D003D001D002D00037
:20119300121E5DE84A70030210C6907017C082C083122172750200D083D082E8F0907017E6
:2011B300E0F87A00C000C00278007A00C000C002D003D001D002D000122154E84A70030260
:2011D300119D907007C082C083907017E0F87A00C000C00278207A00C000C002D003D0019F
:2011F300D002D000121D8E7A00D083D082E8F0907010C082C08378807A3EC000C0029070BF
:201213000CE0F8A3E0FAC000C002D003D001D002D000121D8ED083D082E8F0A3EAF09
070DB
:2012330015C082C083780A7A00D083D082E8F012014E90700EE0F8A3E0FAC000C00278F
FCB
:201253007AFFC000C002D003D001D002D000121E5DE84A700302126E120631D21790235F42
:201273001221C41220FD12213B907017C082C083122172750200D083D082E8F0907017E09B

ES 2 304 573 T3

```

:20129300F87A00C000C00278007A00C000C002D003D001D002D000122154E84A700302124D
:2012B3007C907007E0F87A00C000C00278017A00C000C002D003D001D002D000121E5DE894
:2012D3004A700302130C907018C082C08378017A00D083D082E8F0D2179023611221C4120A
:2012F30020FD12213B907019C082C08378017A00D083D082E8F0D21812907014C082C0837D
:2013130078007A00D083D082E8F0907018C082C08378017A00D083D082E8F0907017C082E5
:20133300C083122172750200D083D082E8F0907017E0F87A00C000C00278007A00C000C061
:201353002D003D001D002D000122154E84A700302132B907017E0F87A00C000C00278520E
:201373007A00C000C002D003D001D002D000121E5DE84A700302138E120631907017E0F80B
:201393007A00C000C00278507A00C000C002D003D001D002D000121E5DE84A70030213CA23
:2013B300907010C082C08378017A00D083D082E8F0A3EAFO12014E907017E0F87A00C0000E
:2013D300C00278447A00C000C002D003D001D002D000121E5DE84A7003021417907010C00B
:2013F30082C083780A7A00D083D082E8F0A3EAF0907015C082C08378047A00D083D082E802
:20141300F012014E907017E0F87A00C000C00278467A00C000C002D003D001D002D000126B
:201433001E5DE84A70030214E0907010C082C08378147A00D083D082E8F0A3EAF0907015D9
:20145300C082C08378087A00D083D082E8F090700CE0F8A3E0FAC000C00278287A3CC00084
:20147300C002D003D001D002D000121DA4C000C002907018E0F87A00C000C002907007E029
:20149300F87A00C000C002D003D001D002D0001221D9C000C002D003D001D002D0001221F8
:2014B300DFE84A70030214C112014E0214E0D2179023631221C41220FD12213B907014C000
:2014D30082C08378017A00D083D082E8F0907017E0F87A00C000C00278547A00C000C00211
:2014F300D003D001D002D000121E5DE84A700302152D907010C082C083782C7A01D083D046
:2015130082E8F0A3EAF0907015C082C083780A7A00D083D082E8F012014E907017E0F87A04
:201533000C000C00278477A00C000C002D003D001D002D000121E5DE84A70030216C39078
:201553007017C082C083122172750200D083D082E8F0907017E0F87A00C000C00278007AF6
:201573000C000C002D003D001D002D000122154E84A7003021552907017C082C08390705F
:2015930017E0F87A00C000C00278207A00C000C002D003D001D002D000121D8E7A00D083E9
:2015B300D082E8F0907018C082C083907018E0F87A00C000C00278017A00C000C002D0031D
:2015D300D001D002D000121D437A00D083D082E8F0907024C082C083907018E0F87A00C049
:2015F3000C002C000C002781A7A00C000C002D003D001D002D000121CCC84A7003021
C03
:20161300BC78027A00C000C002D003D001D002D000121D00C000C002D003D001D002D0
0048
:20163300121D3FC000C00290700CE0F8A3E0FAC000C00278957A00C000C002D003D001
D047
:2016530002D000121D8AC000C002907017E0F87A00C000C002D003D001D002D000121D3
FCB
:20167300D083D082E8F0A3EAF0907018E0F87A00C000C002907007E0F87A00C000C002D0C6
:2016930003D001D002D0001221E6E84A70030216C3D2179023631221C41220FD12213B9003

```

ES 2 304 573 T3

:2016B3007014C082C08378017A00D083D082E8F0907014E0F87A00C000C00278017A00C003
:2016D30000C002D003D001D002D000121E5DE84A700302132E907010C082C08378807A3E35
:2016F300C000C00290700CE0F8A3E0FAC000C002D003D001D002D000121D8ED083D082
E8E2
:20171300F0A3EAF0907010E0F8A3E0FAC000C00278007A00C000C002D003D001D002D0
00A8
:20173300121DA4E84A700302176C907010C082C083907010E0F8A3E0FAC000C00278807AAB
:201753003EC000C002D003D001D002D000121D43D083D082E8F0A3EAF0907010E0F8A3
E099
:20177300FAC000C00278407A1FC000C002D003D001D002D000121D59E84A70030217C412A5
:20179300631907010C082C08378807A3EC000C002907010E0F8A3E0FAC000C002D003D00AB
:2017B30001D002D000121D8ED083D082E8F0A3EAF0907015C082C083780A7A00D083D0
8281
:2017D300E8F012014E90700EE0F8A3E0FAC000C00278FF7AFPC000C002D003D001D002
D020
:2017F30000121E5DE84A7003021801120631907019C082C08378017A00D083D082E8F00230
:201813001823D2179023671221C41220FD12213B907017C082C08378007A00D083D082E8C8
:20183300F0907017E0F87A00C000C00278087A00C000C002D003D001D002D000121E5DE883
:201853004A700302186A907017C082C08378007A00D083D082E8F0907017E0F87A00C00000
:20187300C002780A7A00C000C002D003D001D002D000121E5DE84A70030218A0907017C00C
:2018930082C08378007A00D083D082E8F0907017E0F87A00C000C002780C7A00C000C00296
:2018B300D003D001D002D000121E5DE84A70030218D6907017C082C08378007A00D083D
0FC
:2018D30082E8F0907017E0F87A00C000C002780D7A00C000C002D003D001D002D000121EB9
:2018F3005DE84A7003021972907017C082C083122172750200D083D082E8F0907017E0F822
:201913007A00C000C00278007A00C000C002D003D001D002D000122154E84A70030218FBB
:20193300907017E0F87A00C000C00278217A00C000C002D003D001D002D000121E5DE84A0F
:20195300700302195E12068702196112068A907017C082C08378007A00D083D082E8F09030
:201973007017E0F87A00C000C002780B7A00C000C002D003D001D002D000121E5DE84A7002
:2019930030219A8907017C082C08378007A00D083D082E8F0907017C082C08378007A00D5
:2019B300D083D082E8F022907016E0F87A00C000C00278007A00C000C002D003D001D002A1
:2019D300D000121E5DE84A7003021A1D907018E0F87A00C000C00278007A00C000C002D089
:2019F30003D001D002D000121D59E84A7003021A1AD2A4907016C082C08378017A00D083A4
:201A1300D082E8F0021A1D121AF30221EC78007A00121F2E1211730C000C002907009E0F81D
:201A33007A00C000C002D003D001D002D00012217E84A7003021A27D2A378007A00121F86
:201A53002E907006C082C083A8A07A00C000C00278207A00C000C002D003D001D002D00
09C

ES 2 304 573 T3

:201A7300121F52D083D082E8F0907006E0F87A00C000C00278007A00C000C002D003D00161
:201A9300D002D000121E5DE84A7003021A54C2A3C2A4907006C082C083A8A07A00C000
C057
:201AB3000278207A00C000C002D003D001D002D000121F52D083D082E8F0907006E0F87
ADF
:201AD3000C000C00278007A00C000C002D003D001D002D000122154E84A7003021AA522A8
:201AF300C29775F005D5F0FD29722907010C082C083907024C082C08378197A00C000C0FA
:201B130002C000C002781A7A00C000C002D003D001D002D000121CCE84A7003021CBC
7869
:201B3300027A00C000C002D003D001D002D000121D00C000C002D003D001D002D000121
D28
:201B53003FC000C002D003D00189828B8312215AC000C002907024C082C083907019E0F84B
:201B73007A00C000C002C000C002781A7A00C000C002D003D001D002D000121CCE84A
7064
:201B930003021CBC78027A00C000C002D003D001D002D000121D00C000C002D003D001
D074
:201BB30002D000121D3FC000C002D003D00189828B8312215AC000C002D003D001D002D
03E
:201BD30000121D8AD083D082E8F0A3EAF0907010C082C083907010E0F8A3E0FAC000C0
02C3
:201BF30090700E50F8A3E0FAC000C002D003D001D002D000121DAAD083D082E8F0A3E
AF0D4
:201C1300907015C082C083780A7A00D083D082E8F012014E9070119C082C08378197A00D0C4
:201C330083D082E8F02202221D8587E020E5FAD0D0D0E0D0E0D0D574AA75F055900033
C094
:201C530082C0833253883F53892F438920438780888D758B00D28E2275C7AA75C755D2BF80
:201C730022121C6B75C7AA75C755438704D21D2275C7AA75C7555387FBC21D2289828B8
3DA
:201C9300E493C082C08388828A83F06017DC09E4F015811581021CC4A3A882AA83D083D
0D3
:201CB30082A380DC158115812290236974460222E490237D74500222E4121CE8021CD9B2A9
:201CD300D5A2D58008B3B0D58003B372D54003021CF7021C1FBC2D5EAB50308C2D5B8B
50181
:201CF30002D2D522B4F8FA2278FF7AFF22C3E889F0A4FCADF0E960088AF0A420D2122
DFDFE
:201D1300EB600688F0A420D2072D4004FAA80422D3021D2790219D74140222E490238E7463

ES 2 304 573 T3

:201D33000A0222E49023BA74280222E4D2D58002C2D5C3E829F8EA3BFA10D504A2D2C
2D2D1
:201D53005003021D2722121D5F021CD8C2D5EB33EA121D83901D6B738012D322200EA
CBF7
:201D7300FAE8C9F8121CE820D501B322121CE822333333C3540622D2D58002C2D5C3E8
9B8
:201D9300F8EA9BFA10D504A2D2C2D25003021D2722121D5F021CD9EB33EA121D83C0
E0909E
:201DB3001DB673800F80278003121DEB121DF4EA5B33401F121D00EA30E70A33487014
D0F4
:201DD300E030D01122D0E030D003121DEB22121DEB80B11581021D27E4C398F8E49AF
AC325
:201DF3002E4C399F9E49BF8C322121D5F021CDDC3E94B7005D3021D2F227F007E007C
0065
:201E13007D0075F010121E48EE33FEEF33FFC3EF9B40117005C3EE99400AC3EE99FEEF
9B8C
:201E3300FFD38001C3121E50D5F0DA8C008D028F038E01C322C3E833F8EA33FA22EC33
FC0F
:201E5300ED33FD22121CE8021CD8121D5F021CD488298A2A2230191C301705D21AD0D
022BE
:201E73002008FDC082C083907071C2D5D21BC21AC0D0800ED0D032C082C08390706FD2
D549
:201E9300C0D0C0E0C0F0C000C001C002C003C004C005C006C007D215E0F8A3E0F58385
00F4
:201EB30082E473301052C0E085278CE52804B4C808E40529B52902052AF52830113820134D
:201ED3003520120BE528B52A07E52CB529028002502420171F20081CE5C620E217D0E0D2BD
:201EF30013C212C211C082C083901F04C082C08332021E8ED212D0E0D0D032E4F529F52AF1
:201F1300F528F52CF52BC211C212C213228528E075F005A485E00085F00222750105750326
:201F33000121E03850028225389F0D21043A882D28C2290706FE8F0A3EAF043A88222E8B6
:201F530059F822E849F822907071E8F0A3EAF0D219D2BCC2BAD2B943A884229070DE74
7116
:201F7300F0A37400F09070DC7471F0A37400F0751000751101C208C21722C2ACC082C083DB
:201F9300F89070DCE0F9A3E0F5828983E8F0A3E582B45003907100A882E5829070DDF088AB
:201FB300828983A3E582B45003907100A8829070DEA3E0850008D2AC0000C2AC80F420089E
:201FD30004D208D299D083D082D2AC22209846C299300E030220B5C0E0C082C083C000
C04A

ES 2 304 573 T3

:201FF30001C002C0039070DDE0FA9070DEE0F9A3E0F8B30205C2080220A785038285018
3FA

:20201300E0F599A3E582B45003907100E5829070DFF00220A7C0E0E599C29820150302205C
:20203300B3B40306200F03022113B41304D20E806FB41109300E69D299C20E8063C082C086
:2020530083C000C001C002C003FA907085E0F8907083AB82907086E0F9A3E0F5828983A3D5
:20207300E382B50303907073EAF0E583A982907086F0E9A3F0B5001C907084E0F5838882A2
:20209300A3E582B50303907073E583A982907084F0E9A3F0D003D002D001D000D083D08287
:2020B300D0E0D0D0032E060061220C9A380F72008FD222008FD221220D0121F8D227911B482
:2020D300200040020722B40D03770122B408021722B40A07D0E0D0E002210222C000C0E041
:2020F300121F8DD0E0D000D8F322740D1220C9740A121F8DE5106005F8B41220E5F22C2A
F00

:2021130090211BC082C08332C3721B721A500890212AC082C083323008033099PD85158147
:20213300801D04C2AF80FE222008FDC21712214422301A0C902153C082C083C0D0021E689C
:2021530022121CE8021CD2E0F8A3E0FA22C3A3E033400302216C021DFD121D5F021CDE
C01C

:20217300A853A8E8907087E0F8907083AB82907084E0F9A3E0B500047800801A8983F58281
:20219300A3E582B50303907073E0F8AB82E583907084F0E8A3F0D0A822907073AA83A98230
:2021B300907084EAF0A3E9F0907086EAF0A3E9F072E47360061220C9A380F62008FD22E814
:2021D30049F8EA4BFA22121CEE021CD9E859F8EA5BFA22121CEE021CD4D007D006D0
05D04D

:2021F30004D003D002D001D000D0F0D0E0D0D020D509D083D082D0D0C21B32D083D08
2D0AB

:20221300D0C21322121CE8021CDDC2111220C580F67433C3301R02940EF3F0E581B515001D
:20223300400C747FF42581400525F040012285158102224790241B74640222E4C082C0833B
:202253001220FD9024411221C412226AD083D0821221C41220FD229024481221C490715B76
:2022730012215A907151A982AB8312228D9071511220B890244F1221C422C3E84A7006C0CF
:20229300E07C01800E7C00790A1222B2C0010CE84A70F47930D0E029FOA3DCF9E4F022
AF69

:2022B30002AE00AB0178077902EF8BF084AAFOFF18E6D7C48BF084AAFOC4C6C4D7C48
BF098

:2022D30084AAFOD6A806AA07A9F072E8F0A3EAF022B42800500122C0E0C000C002C0E
0C095

:2022F30082C08390715912215A90715B1222DE083D082D0E0B42800400612224F2008FD92
:20231300D002D000D0E090715DF0B4500122B42800500122B4960122301B0B301A089023CC
:2023330039C082C08332C2AF80FEC2AF301B0B301A0890234DC082C08332C2AF80FE504557
:20235300533A5354455020322E3330004F004500450045004500417272617920496E6465BC
:202373007820546F6F2042696700537472696E67205472756E63617465640044697669641D

ES 2 304 573 T3

:2023930065206279205A65726F004D617468204F766572666C6F77004D61746820556E643B
:2023B3006572666C6F77004D61746820417267756D636E742042616400496E7075742056E1
:2023D300616C756520346F6F204269670D496E7075742056616C7565204572726F7200491F
:2023F3006E7075742056616C7565204E656761746976650049737461636B2F4235322043F9
:202413006F6E666C6963740049737461636B204572726F7200566563746F722072656C6FEC
:20243300636174696F6B204641494C4544004552524F522000284C696E652000293A200049
:0E245300535441525455502F52455345340096
:00003301CC

Archivo hex (IC 16) procesador serie "snoop" (Serial5.hex):

:10000000680006061E0A1209080C2A0003042803C9
:100010000606E8051009EA02060A08022900000A95
:10002000540C130A6C0C2B00EB02140A0008010C90
:100030000600000C0500060C2500000A120C8901C0
:1000400043066504130C890143066505140C8901F8
:1000500043060504150C890143060505160C8901A4
:1000600043062504170C890143062505180C890150
:1000700043064504190C890143064505200C2B0055
:06008000EB02400A000A39
:0203FE00170ADC
:00000001FF

REIVINDICACIONES

1. Recipiente compuesto de plástico/cristal para contener una muestra biológica mientras se lleva a cabo la ampli-
5 ficación de ácido nucleico, comprendiendo dicho recipiente un material ópticamente claro, configurado para contener un máximo de 1 ml de muestra, comprendiendo además:

a) una parte en forma de tubo capilar que está cerrada en un extremo,

10 b) una parte de reservorio (450C) siendo la parte en forma de embudo unida al extremo abierto de la parte en forma de tubo capilar; y

c) una estructura para sellar la parte en forma de tubo capilar

15 en la que dicha parte en forma de embudo está fabricada de plástico.

2. Recipiente, según la reivindicación 1, en el que dicha parte en forma de tubo capilar tiene una punta con una curvatura exterior y/o una curvatura interior.

20 3. Recipiente, según la reivindicación 1, en el que dicha estructura comprende un tapón que es colocado en la parte en forma de embudo para cerrar el recipiente de plástico/cristal.

4. Recipiente, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que una muestra cargada en la parte en forma de tubo capilar es capaz de formar una columna de fluido de 0,2 a 2,0 cm.

25 5. Varios recipientes compuesto de plástico/cristal colocados en un carrusel rotativo, siendo dichos recipientes adecuados para contener una muestra biológica fluida mientras se lleva a cabo la amplificación de ácido nucleico, comprendiendo cada recipiente un material ópticamente claro, configurados para contener un máximo de 1 ml de muestra, comprendiendo cada recipiente además:

30 a) una parte en forma de tubo capilar que está cerrada en un extremo; y

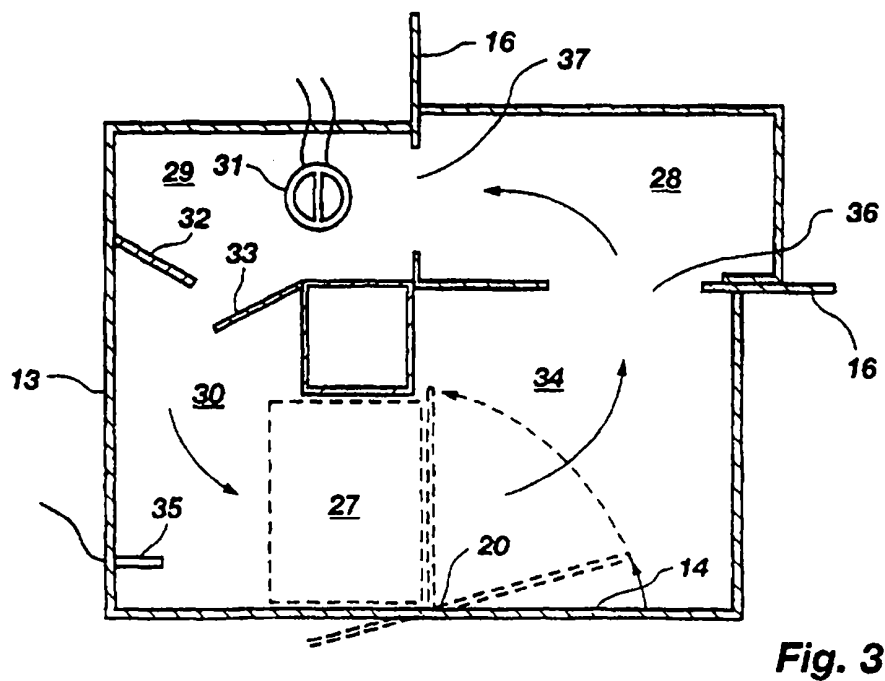
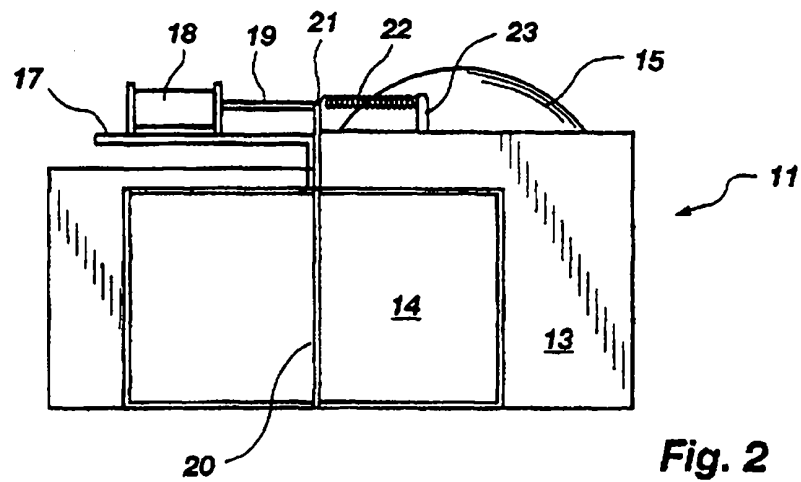
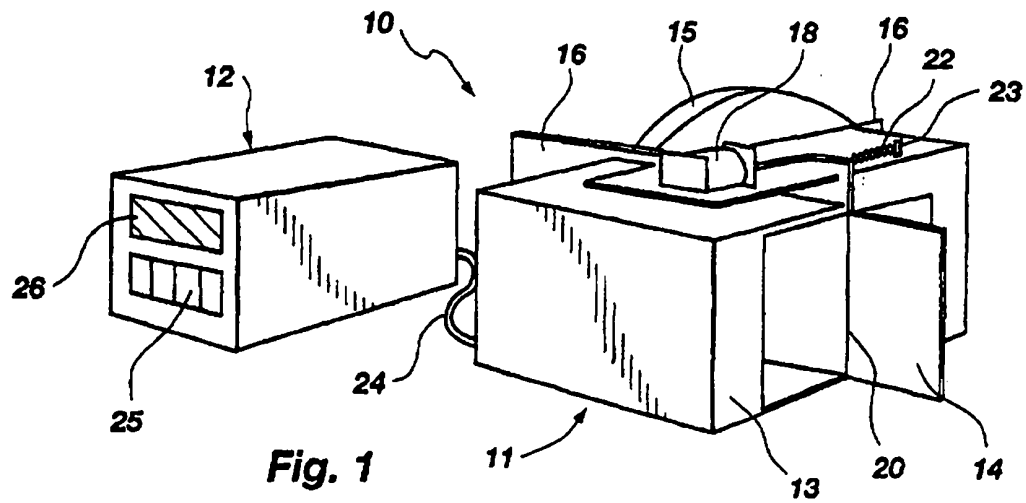
b) una parte de reservorio (450C) siendo la parte en forma de embudo unida al extremo abierto de la parte en forma de tubo capilar. En el que dicha parte en forma de embudo está fabricada de plástico.

35 6. Varios recipientes de plástico/cristal, según la reivindicación 5, en los que cada recipiente es capaz de formar una excitación epifluorescente y una trayectoria de detección.

40 7. Varios recipientes de plástico/cristal, según la reivindicación 6, en los que la trayectoria de detección es enfocada en la punta de la parte en forma de tubo capilar.

8. Uso de un recipiente de plástico/cristal, según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, para PCR en Tiempo Real, **caracterizado** porque dicho recipiente es para contener una mezcla biológica fluida mientras se lleva a cabo la amplificación de ácido nucleico.

45 9. Uso de un recipiente de plástico/cristal, según la reivindicación 8, para una reacción termocíclica en la que dicho termociclo es obtenido mediante un fluido de aire caliente y ambiente.



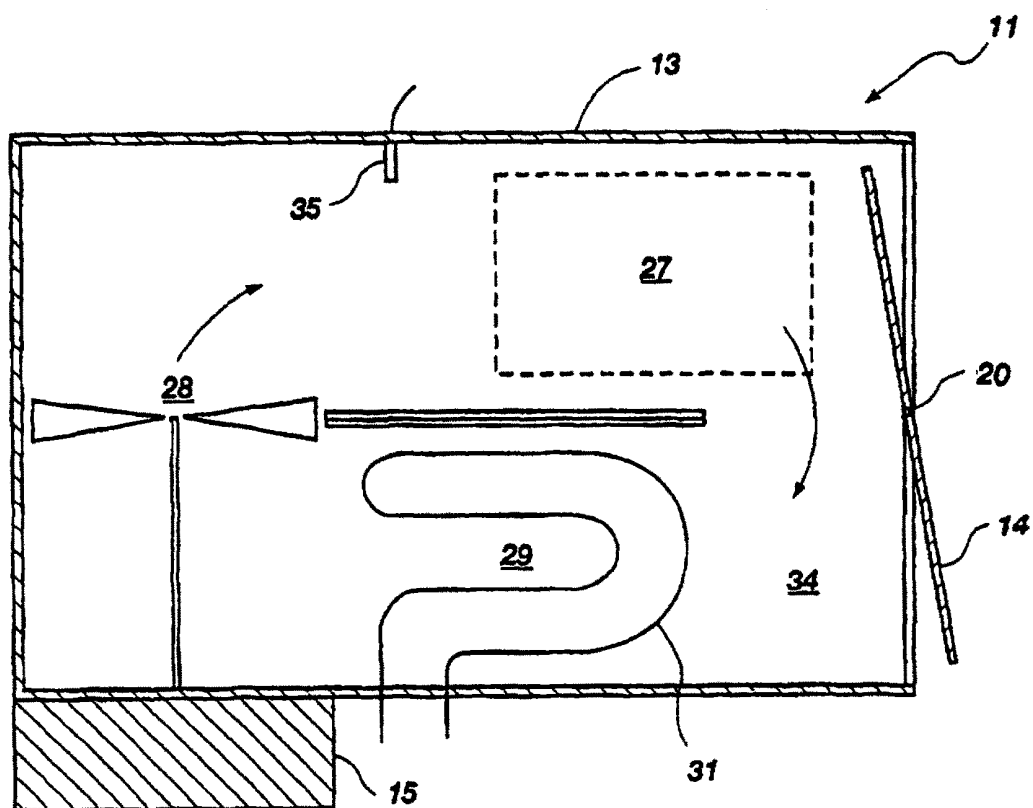


Fig. 4

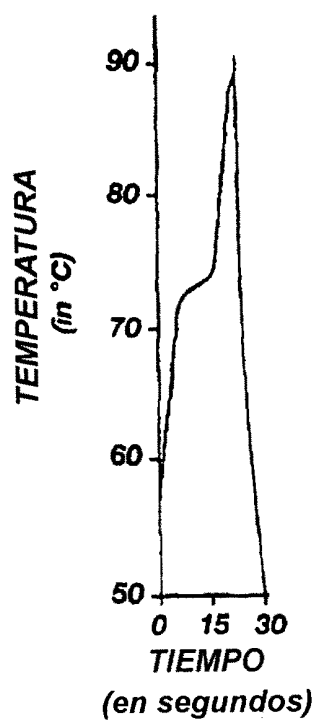


Fig. 5

*Efecto de tiempo de reasociación sobre el rendimiento
del producto y la amplificación de fondo*

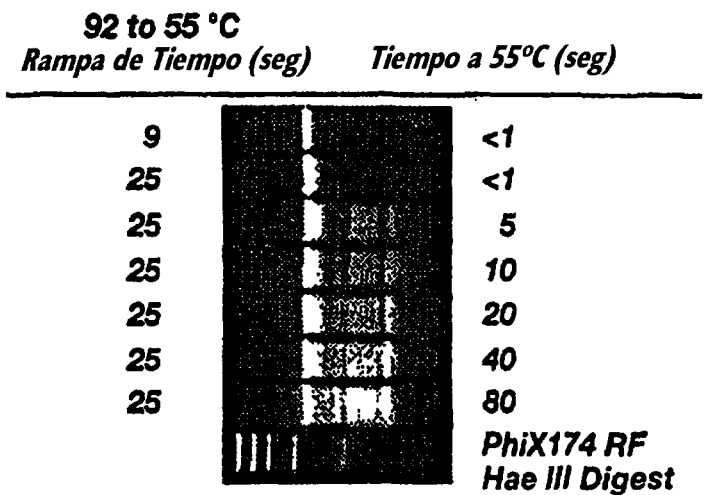


Fig. 7

*Efecto del tiempo de desnaturalización
sobre el rendimiento del producto*

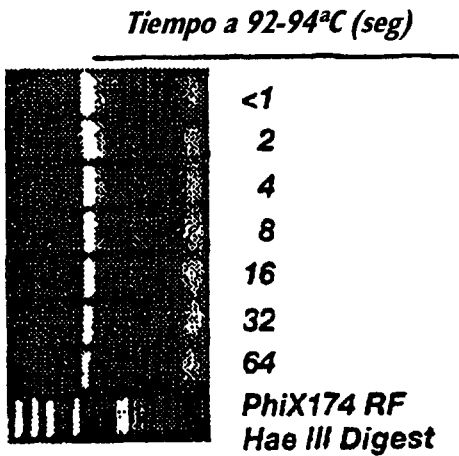
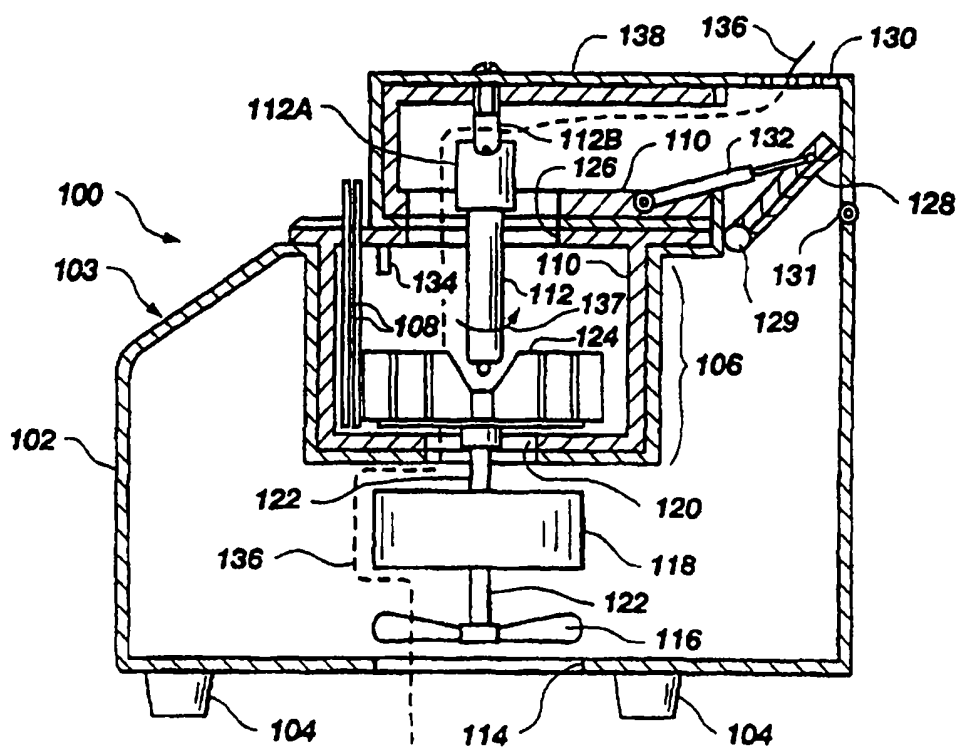
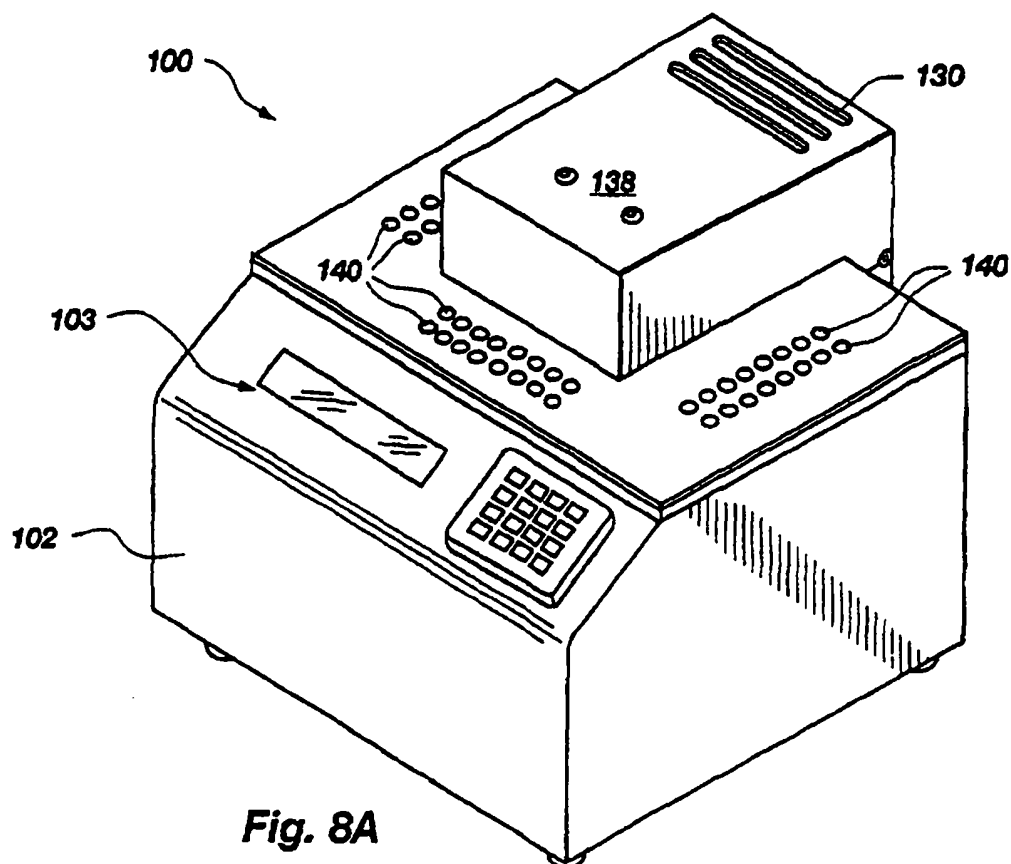


Fig. 6



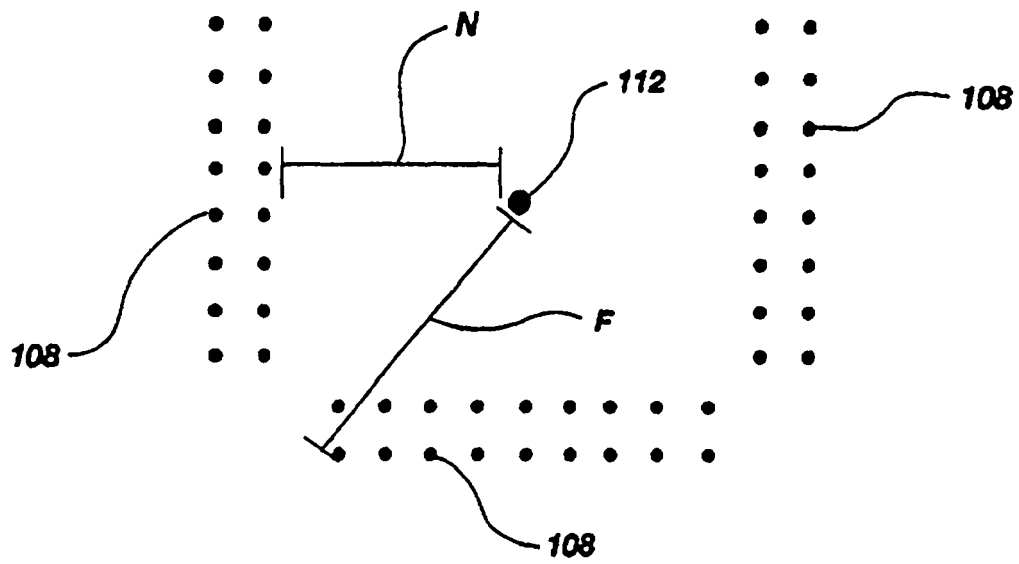


Fig. 8C

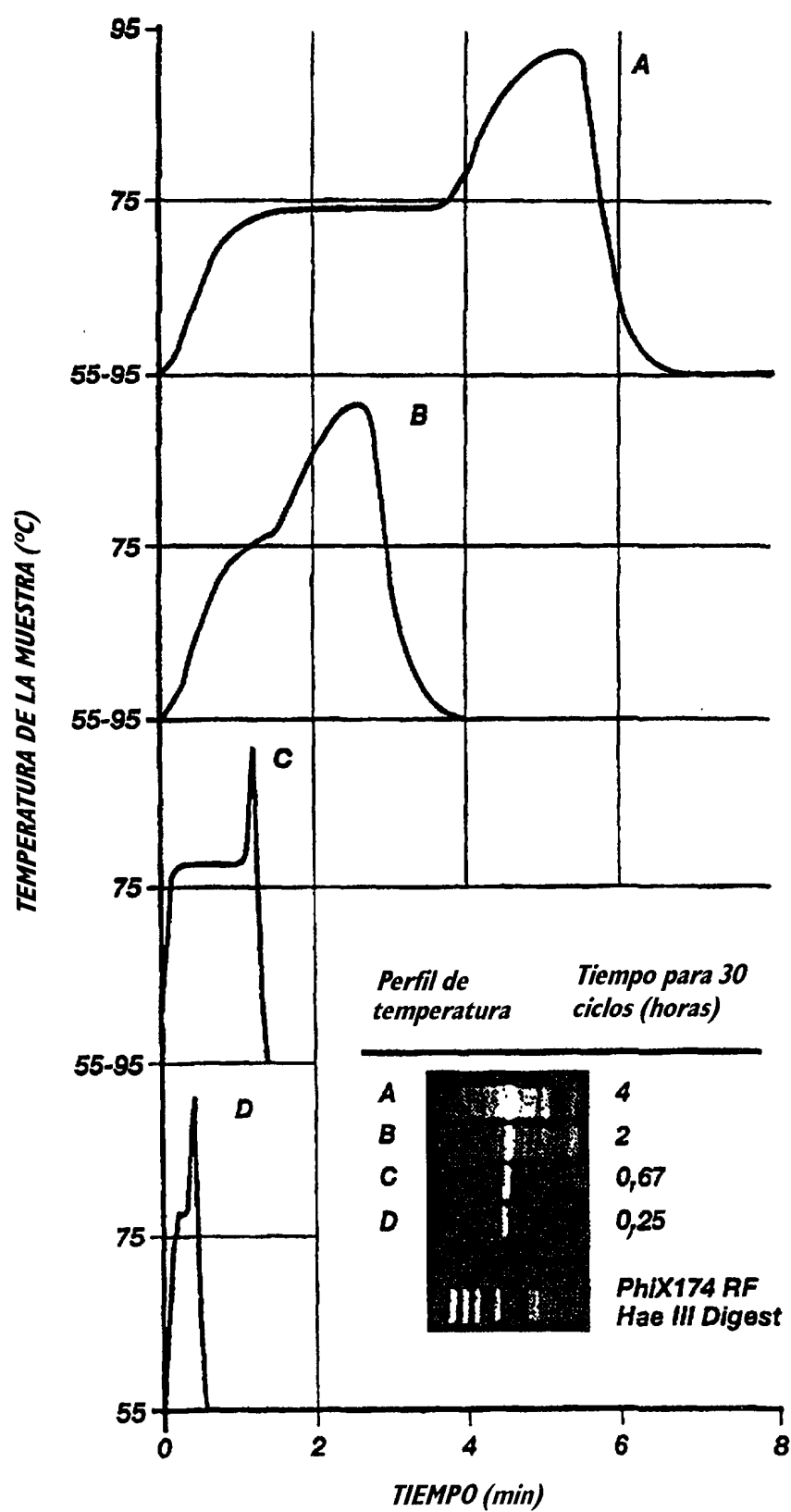


Fig. 9A

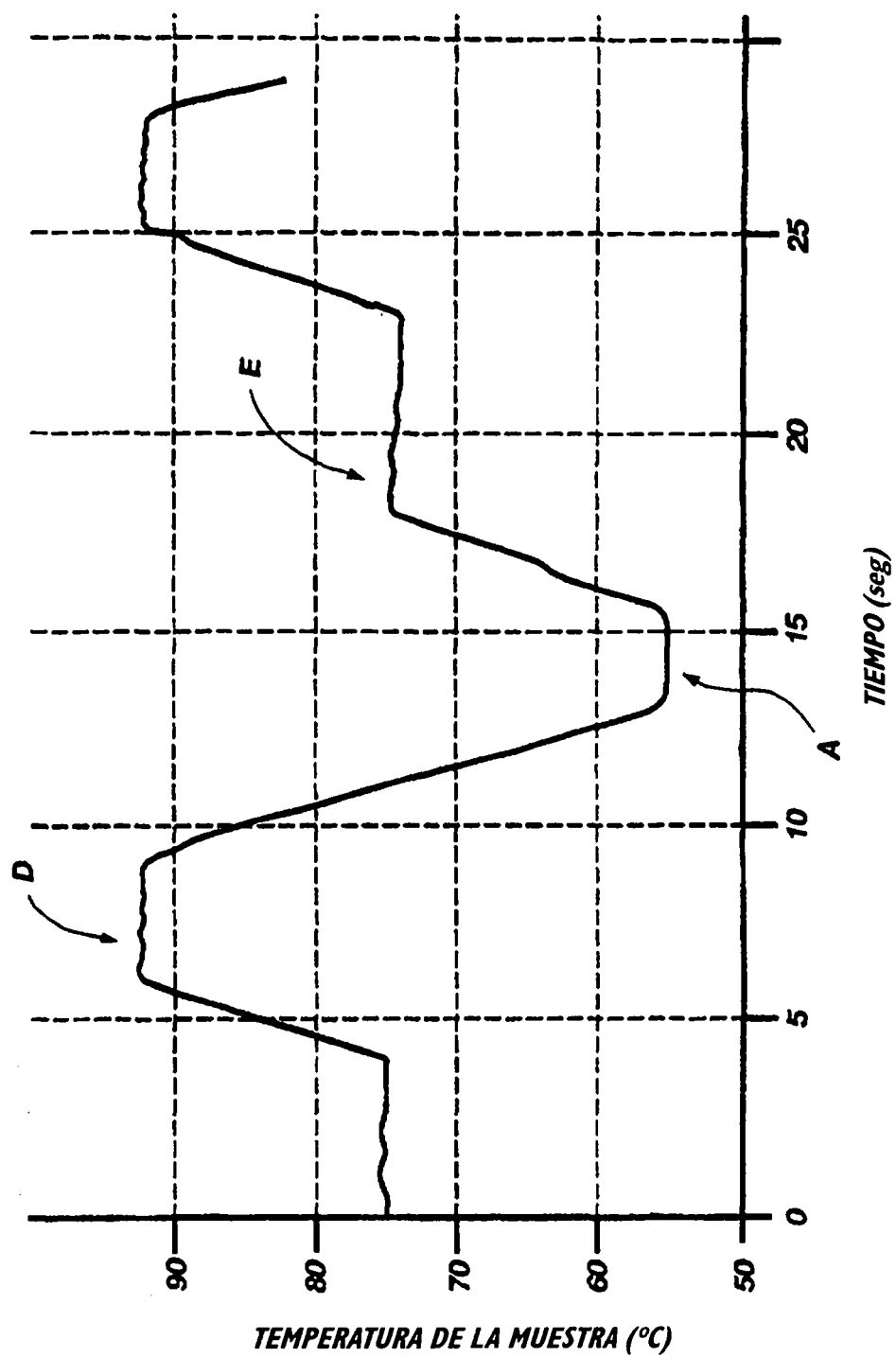


Fig. 9B

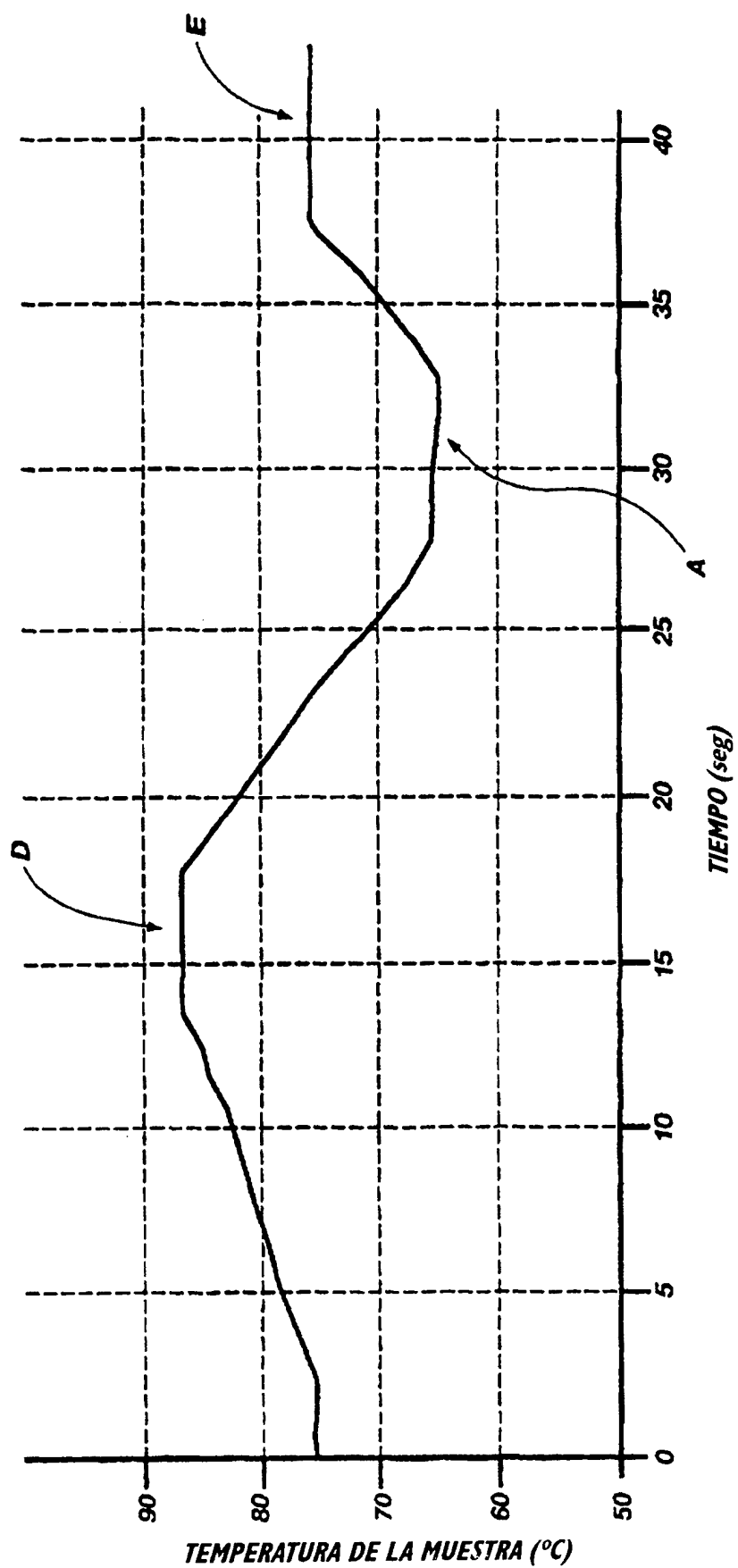


Fig. 9C

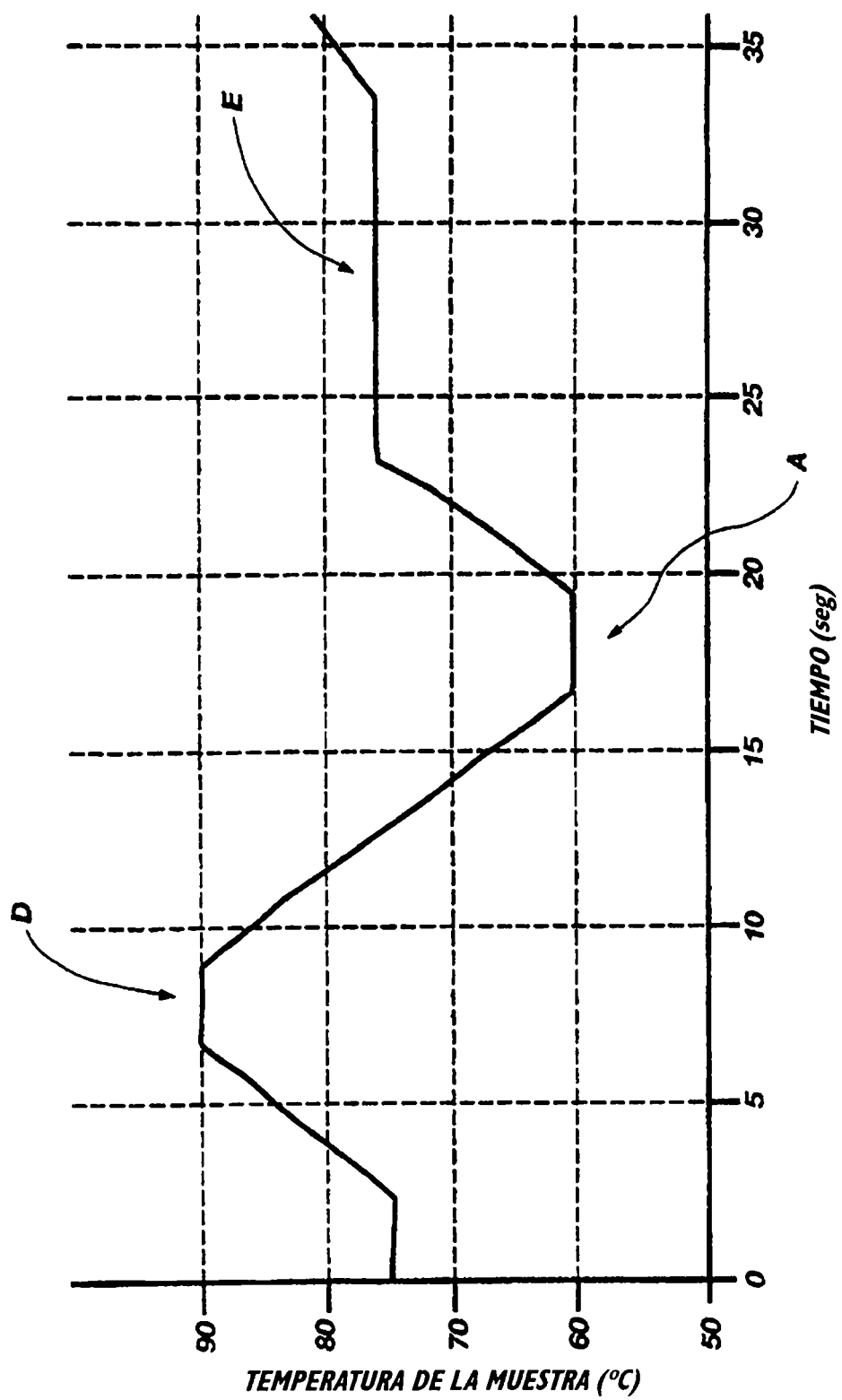


Fig. 9D

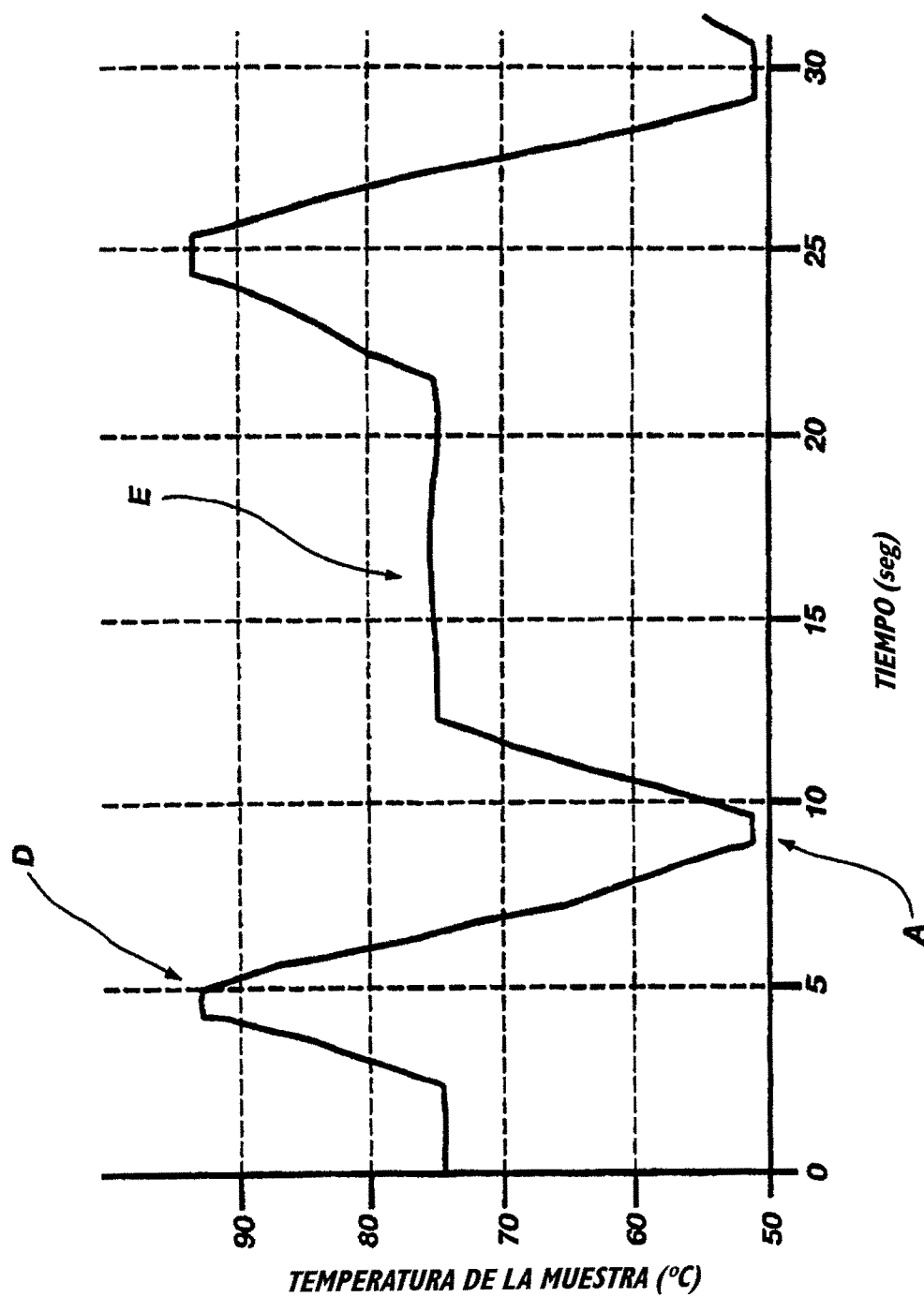


Fig. 9E

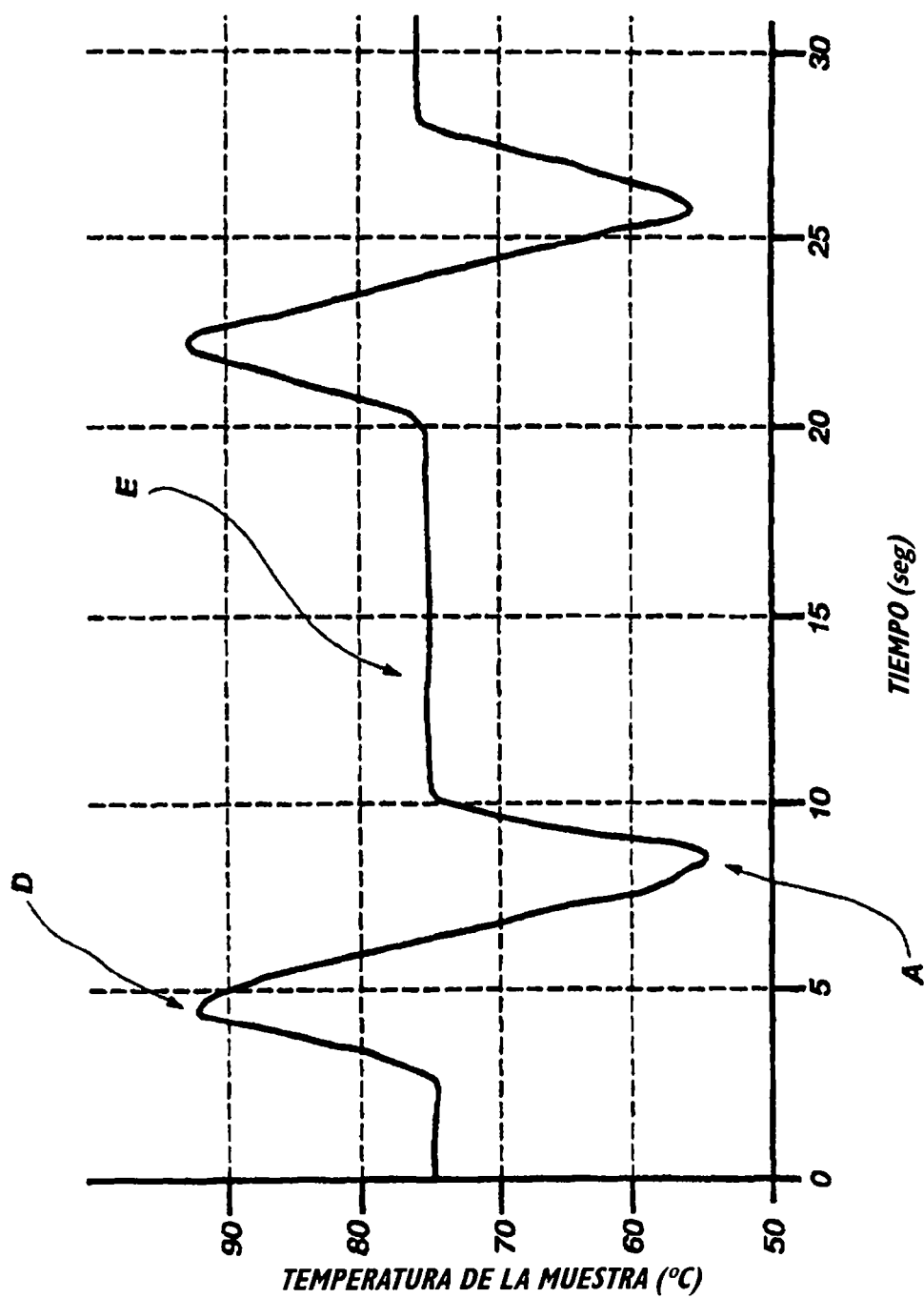


Fig. 9F

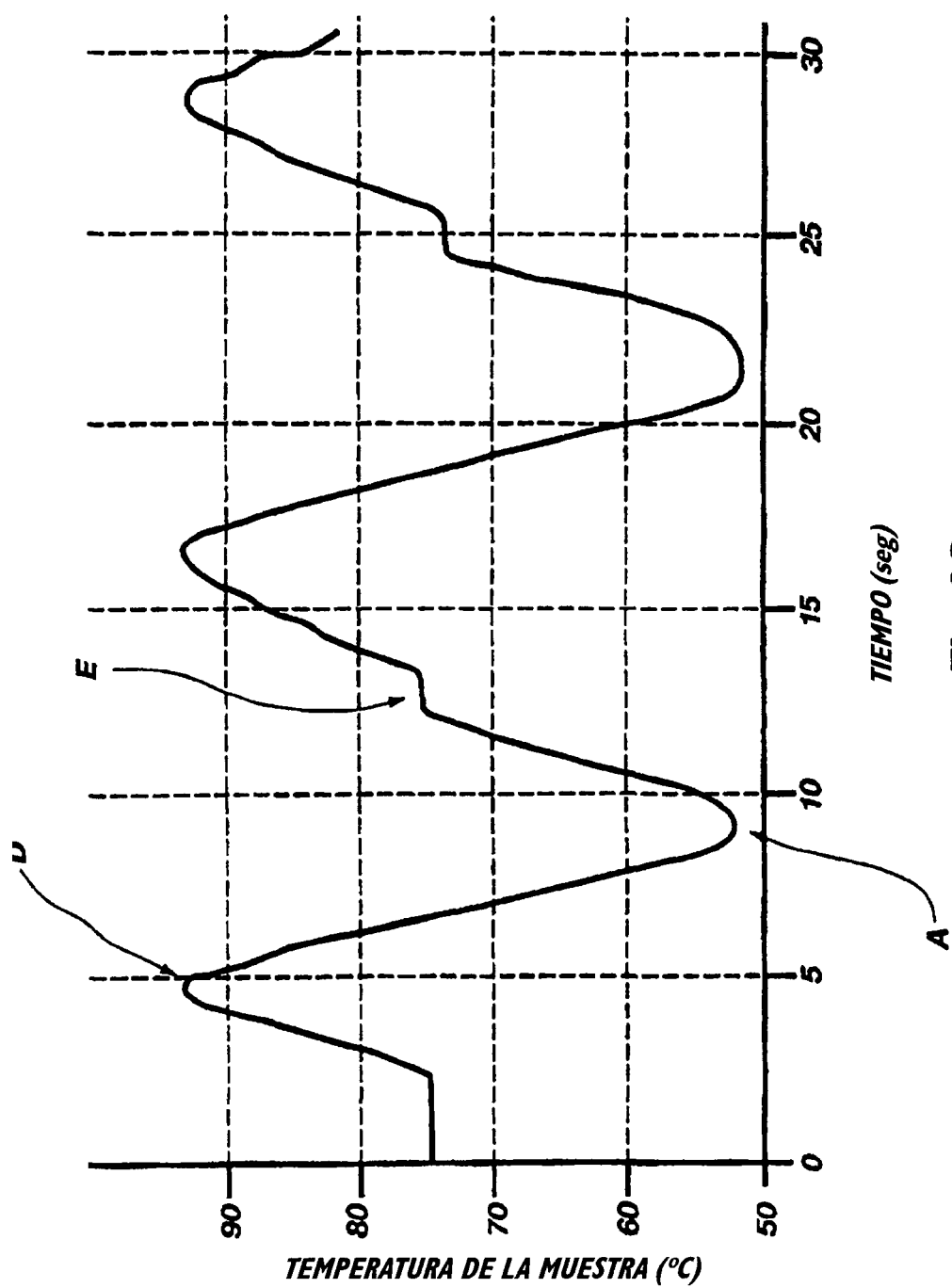


Fig. 9G

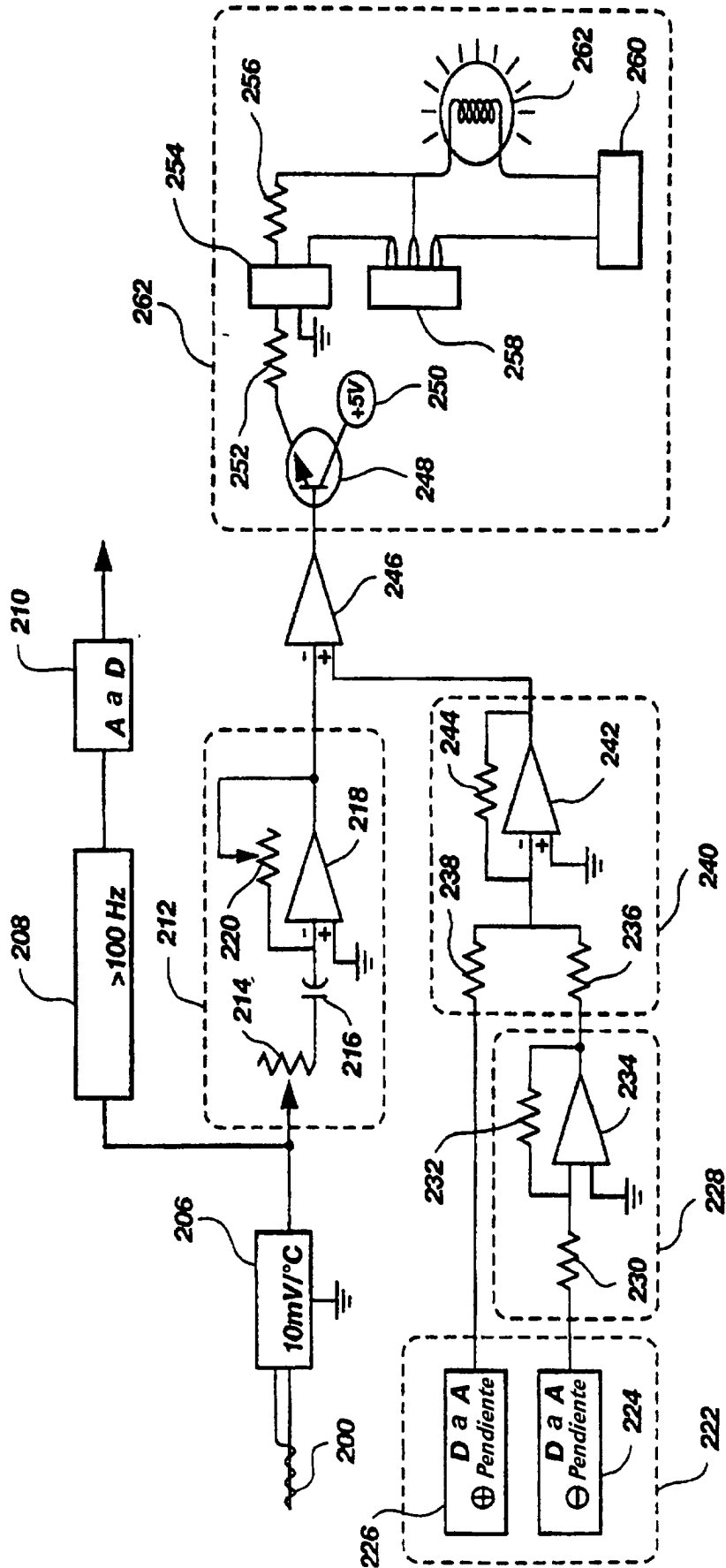


Fig. 10

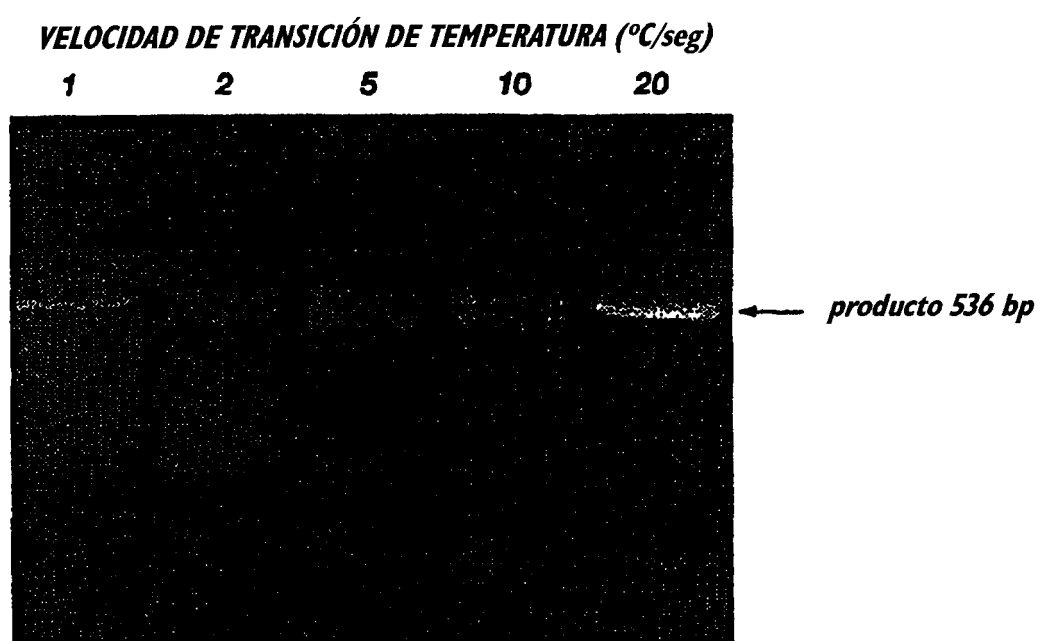


Fig. 10A

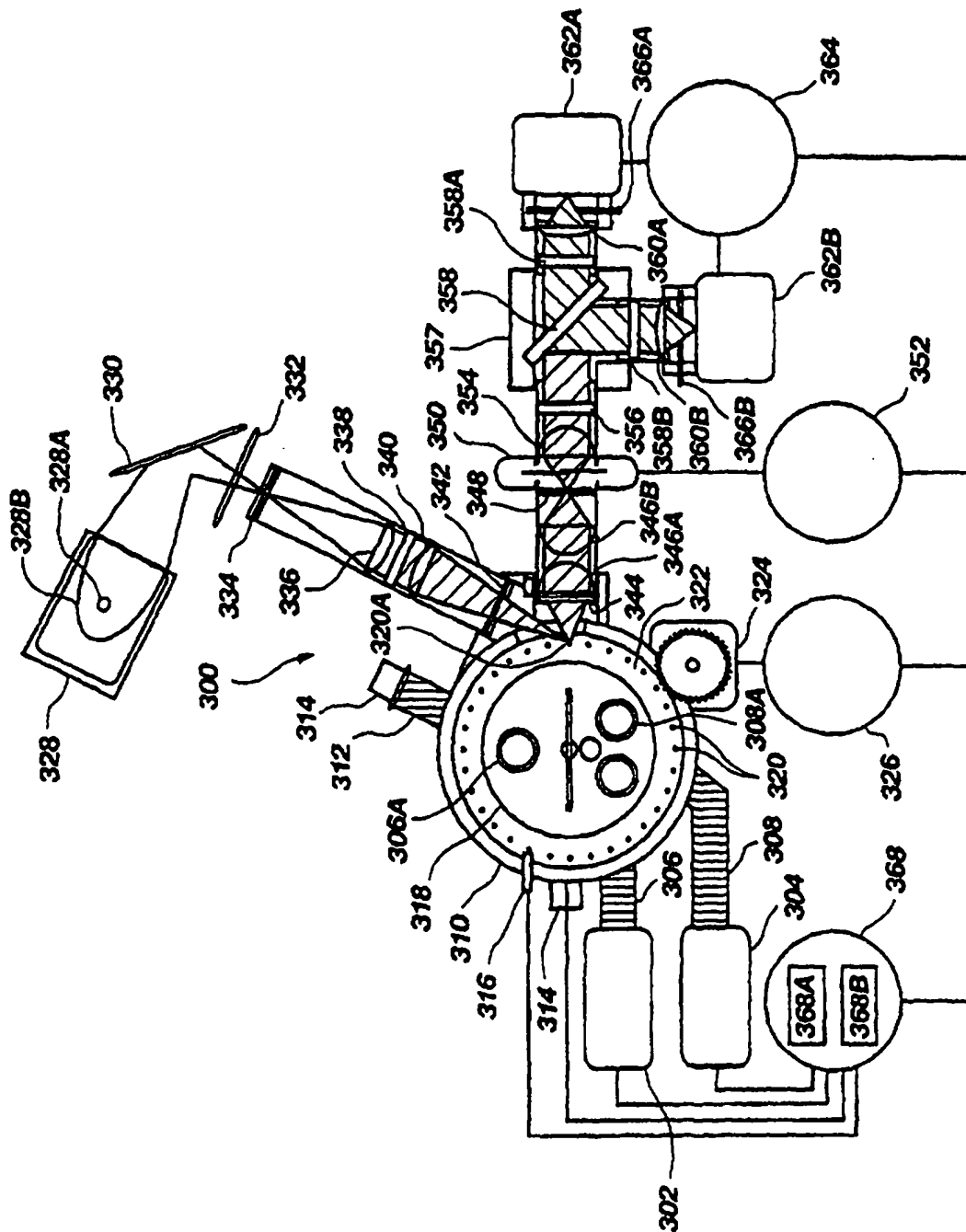


Fig. 11

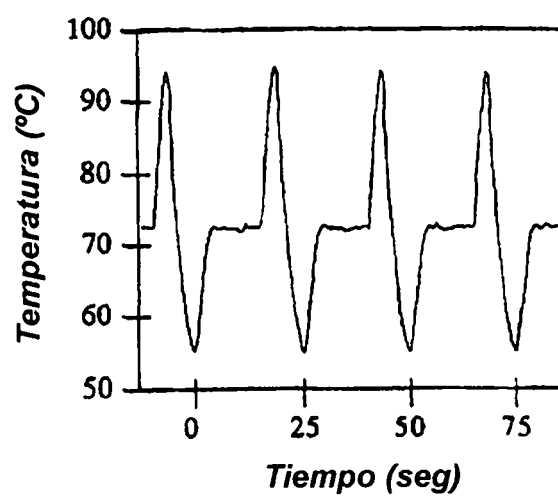


Fig. 11A

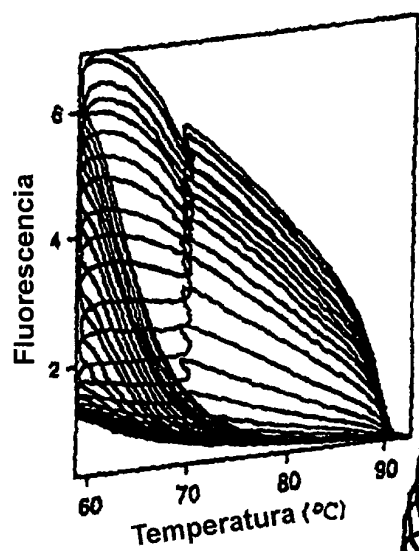


Fig. 12C

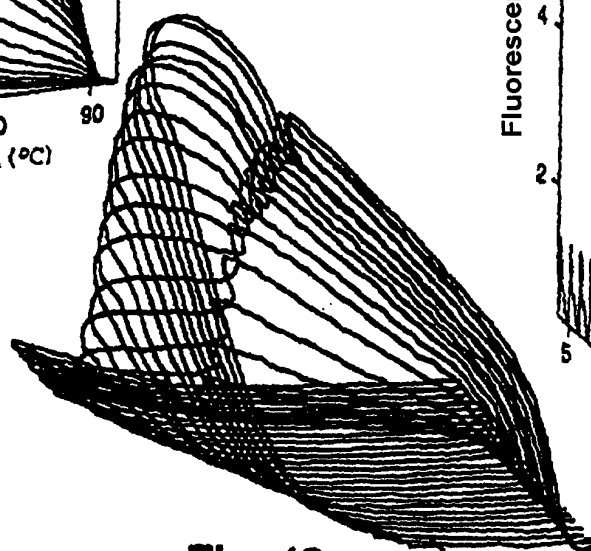


Fig. 12

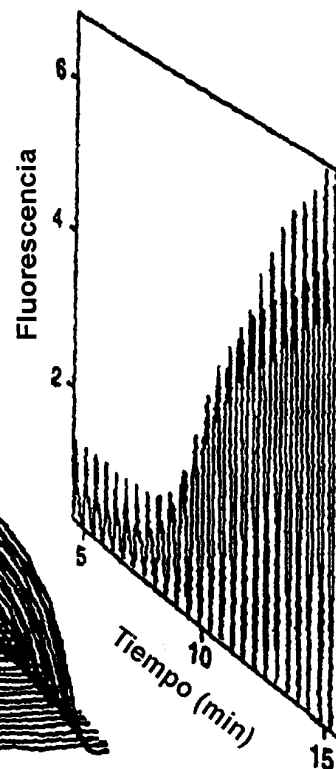


Fig. 12B

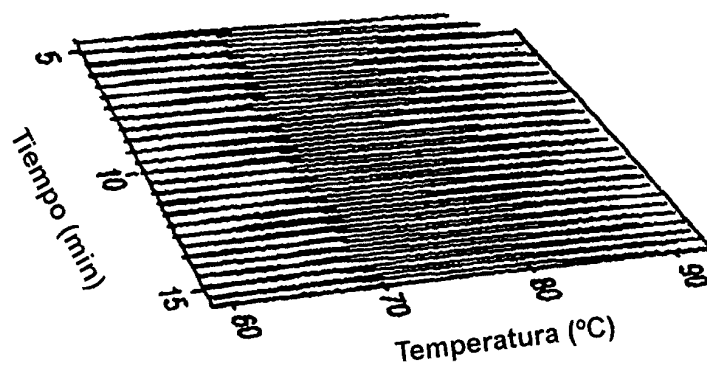


Fig. 12A

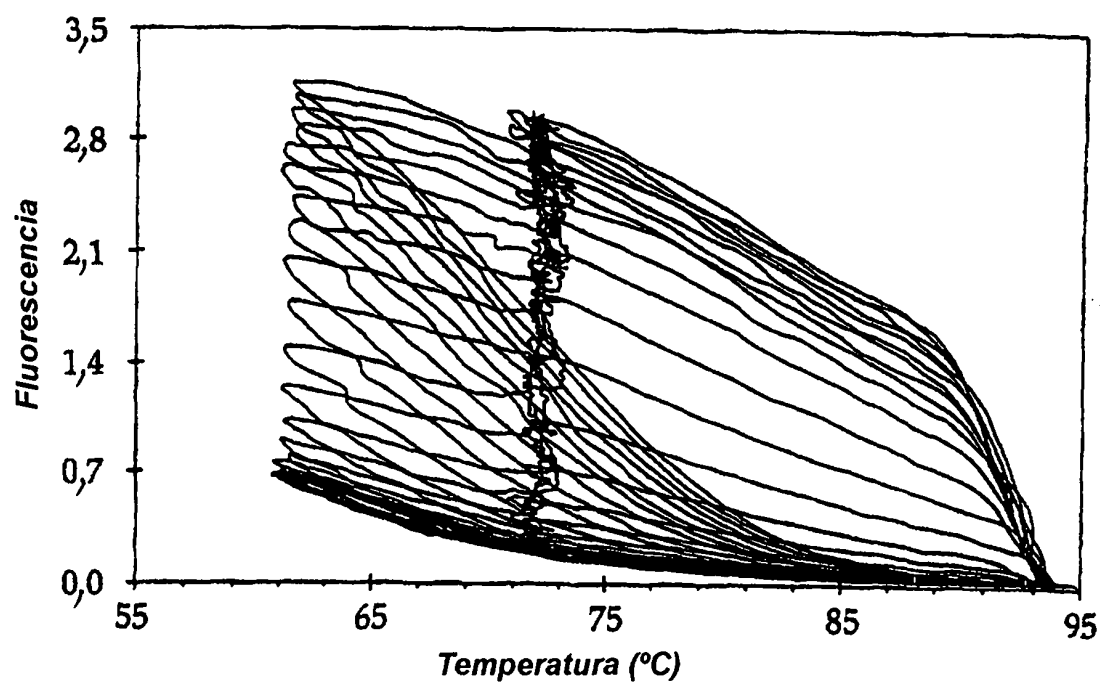


Fig. 13

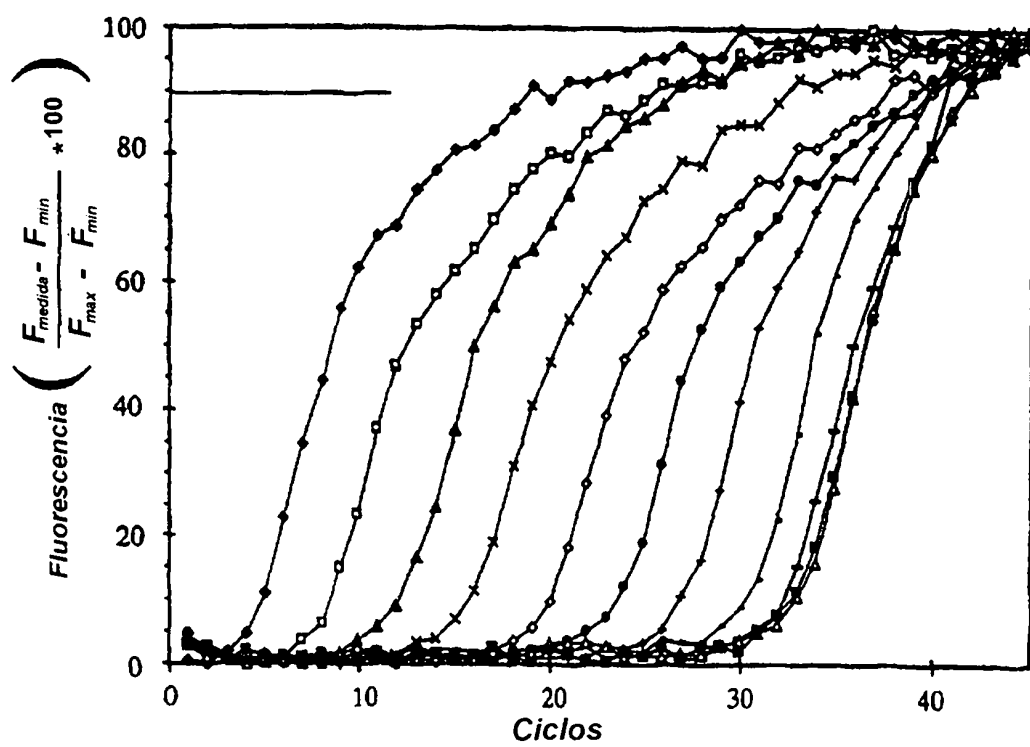


Fig. 14

**Copias
Inciales matriz**

- ◆ 10^9
- 10^8
- ▲ 10^7
- × 10^6
- ◇ 10^5
- 10^4
- + 10^3
- 10^2
- 10
- 1
- △ 0

Fig. 14A

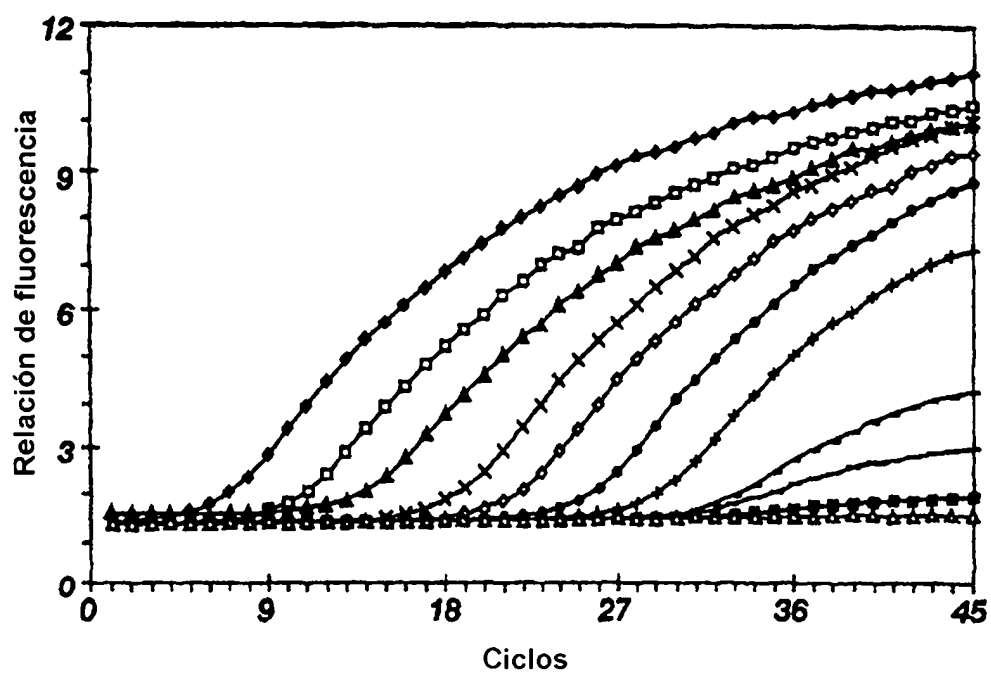


Fig. 15

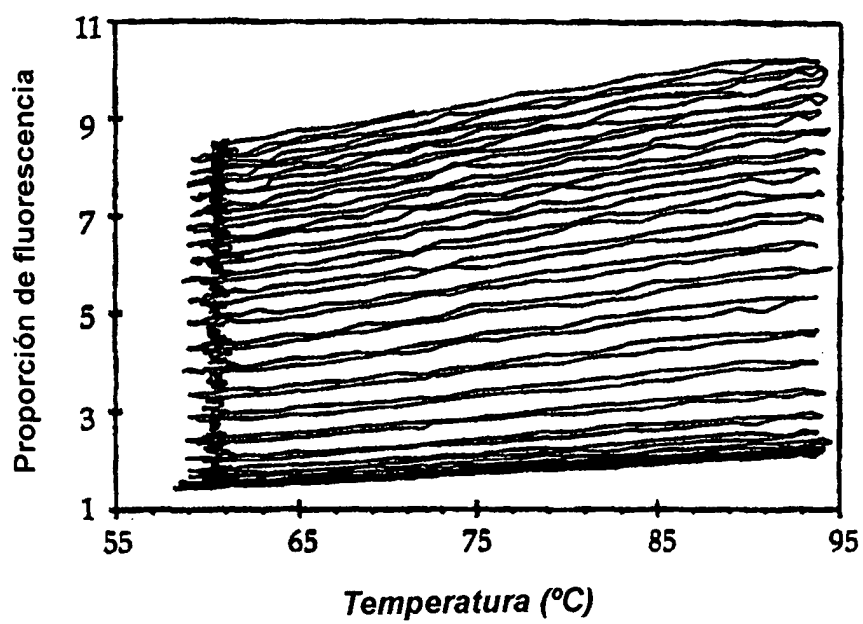


Fig. 16

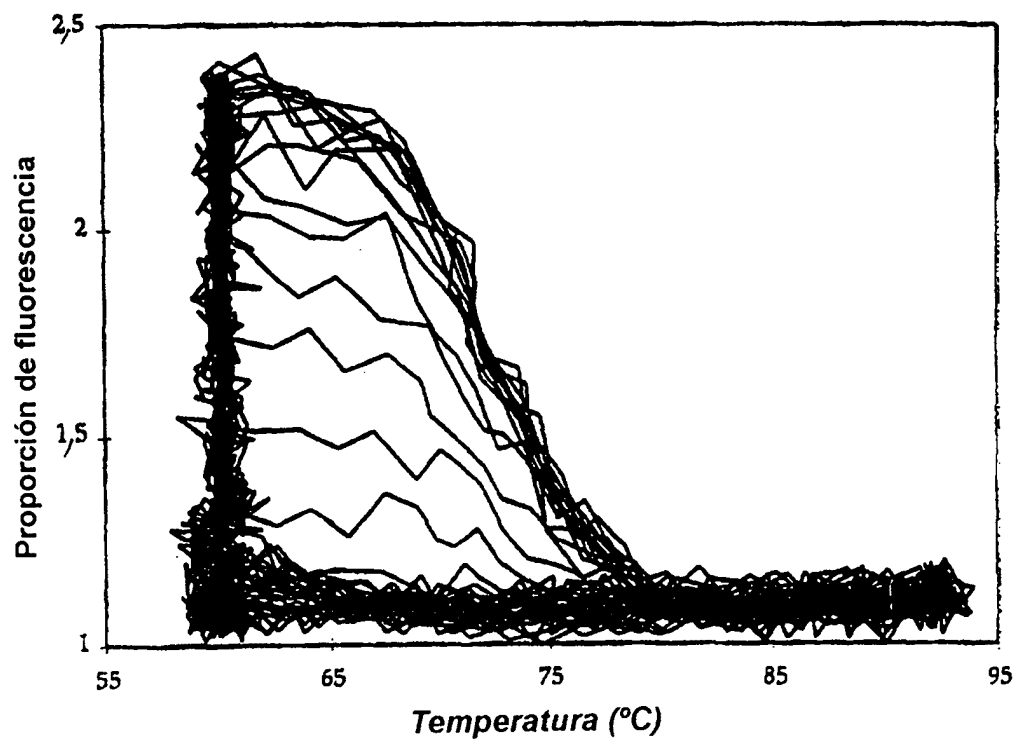


Fig. 17

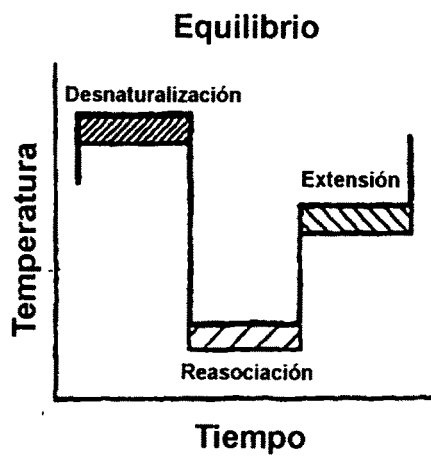


Fig. 18A

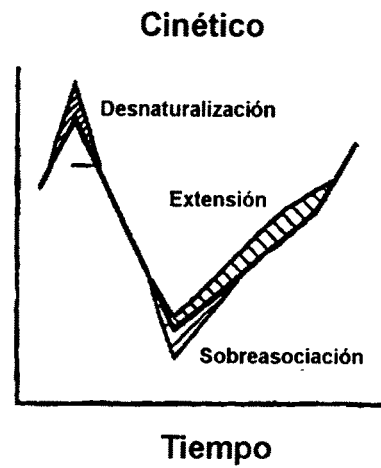


Fig. 18B

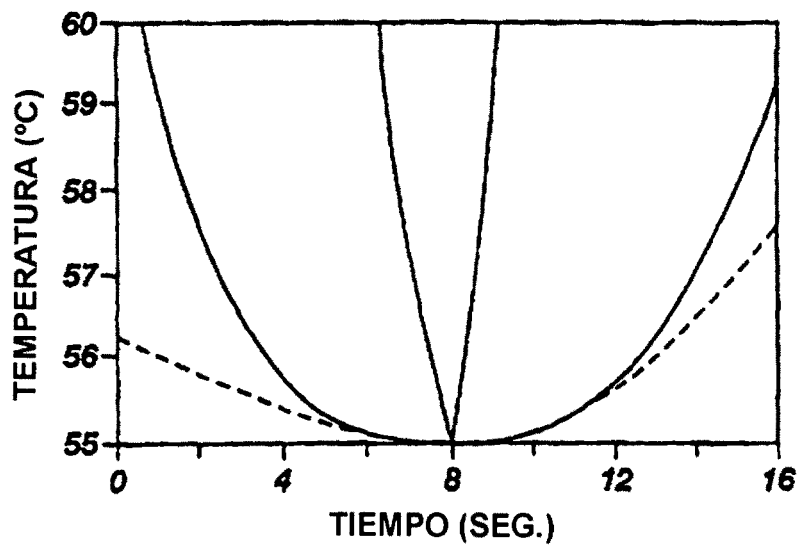


Fig. 18C

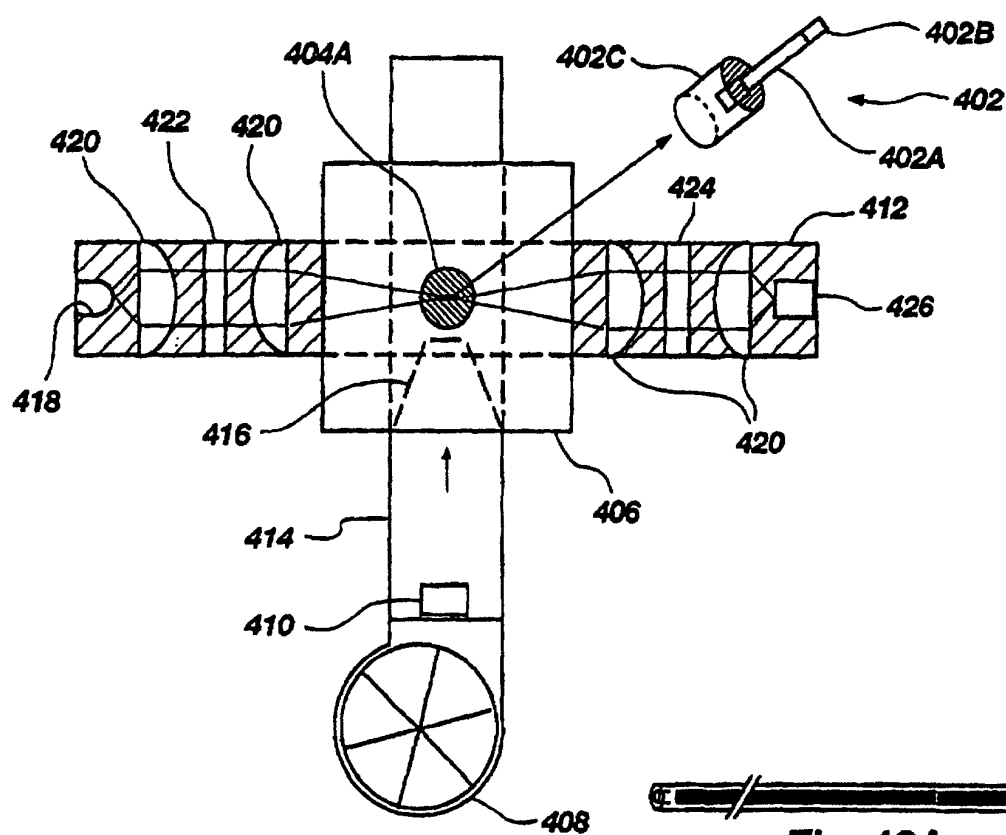


Fig. 19



Fig. 19A



Fig. 19B



Fig. 19C



Fig. 19D

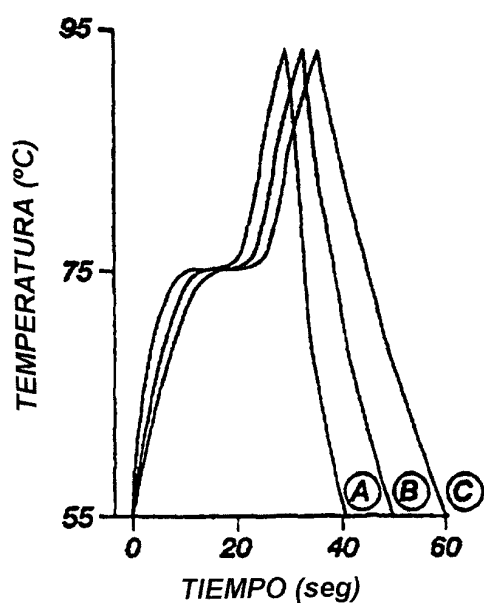


Fig. 19E

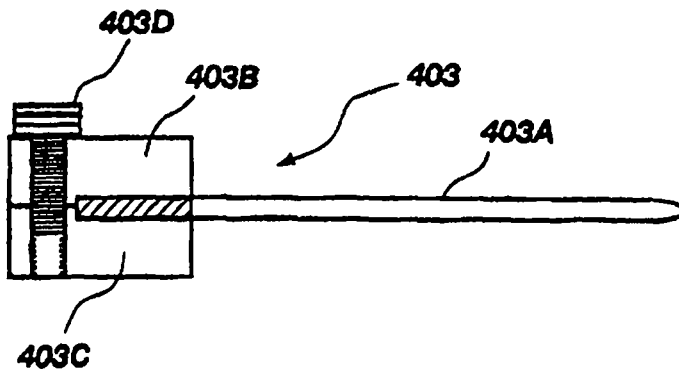


Fig. 19F

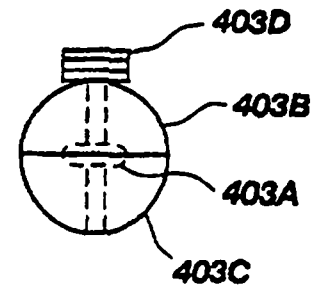


Fig. 19G

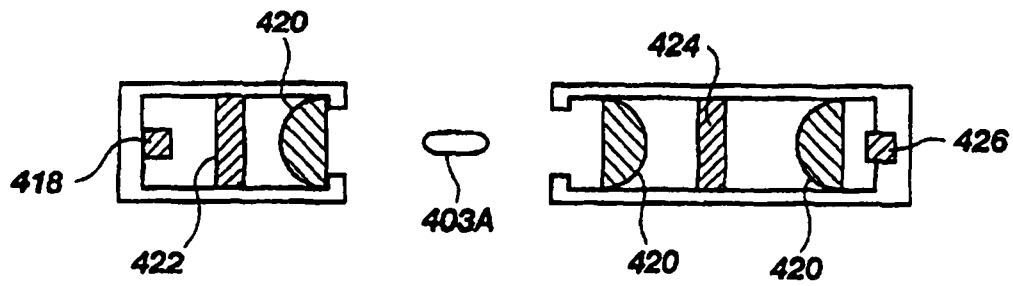


Fig. 19H

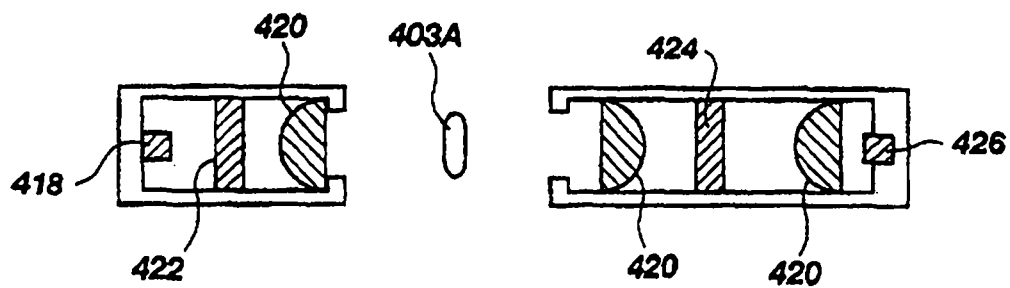


Fig. 19I

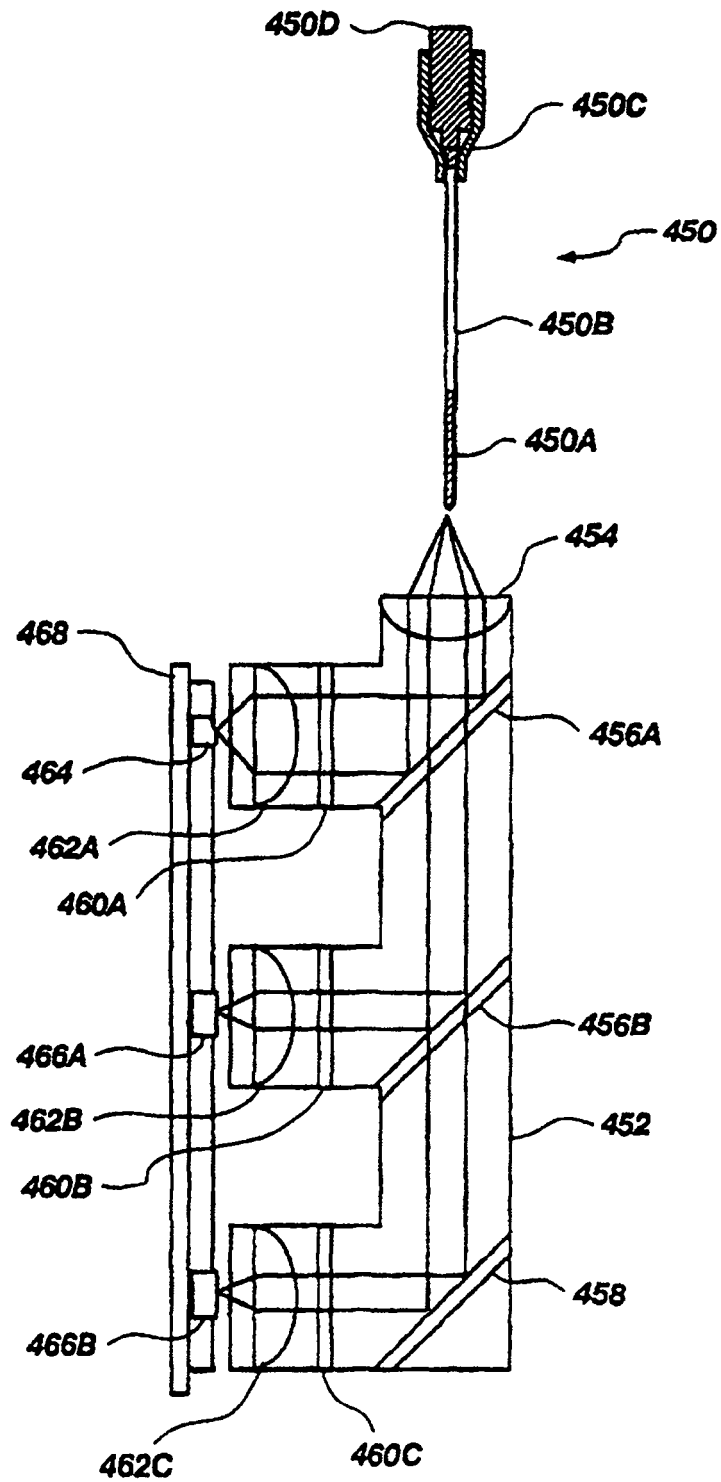


Fig. 20

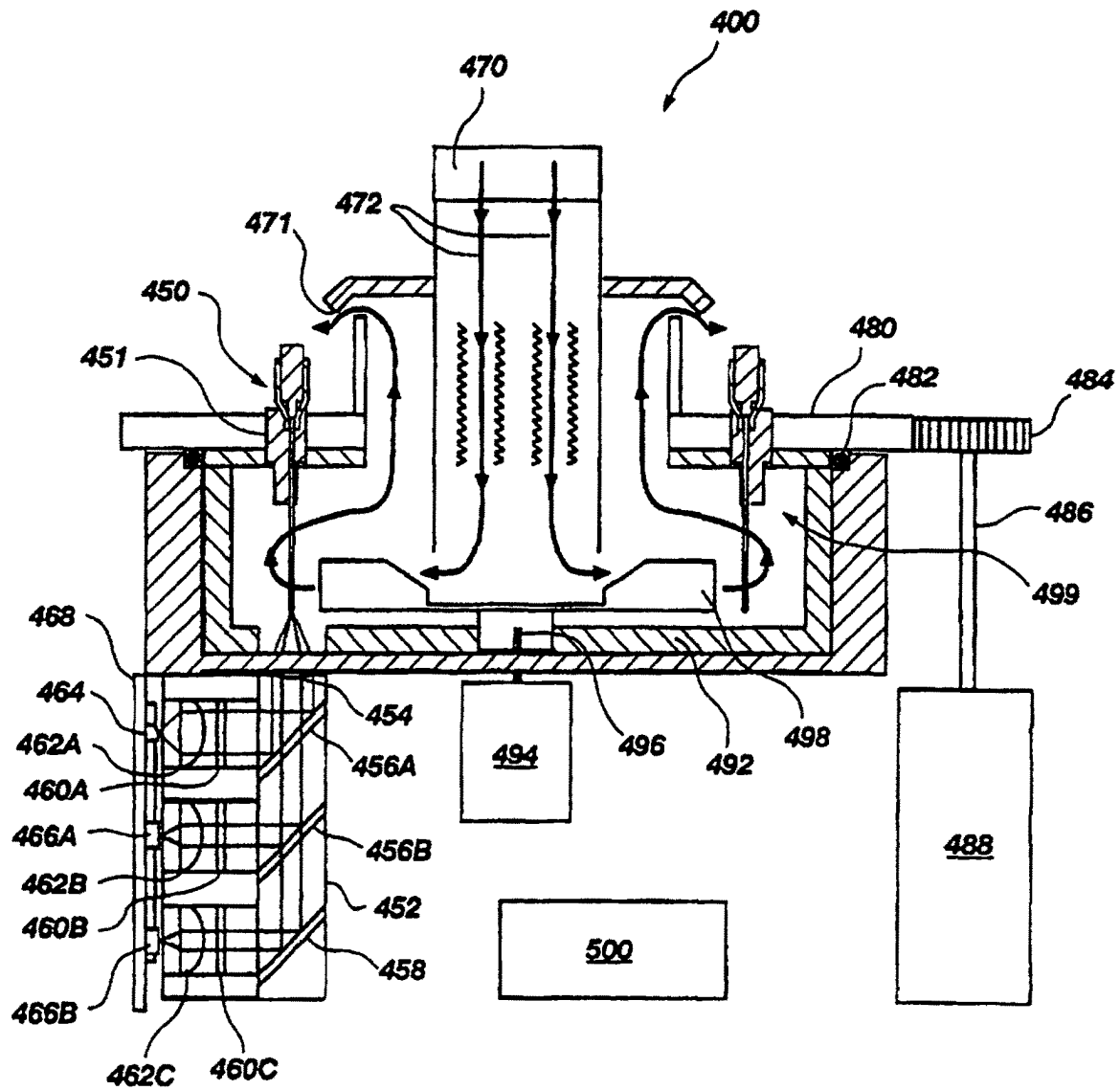


Fig. 21

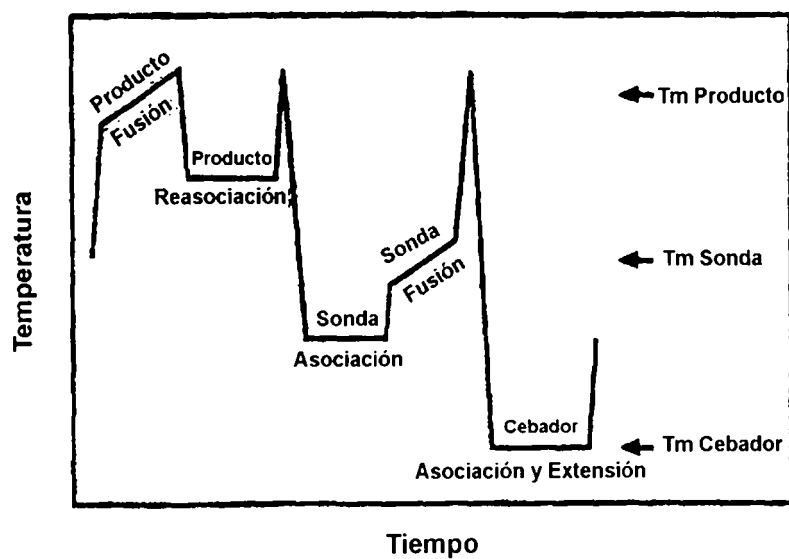
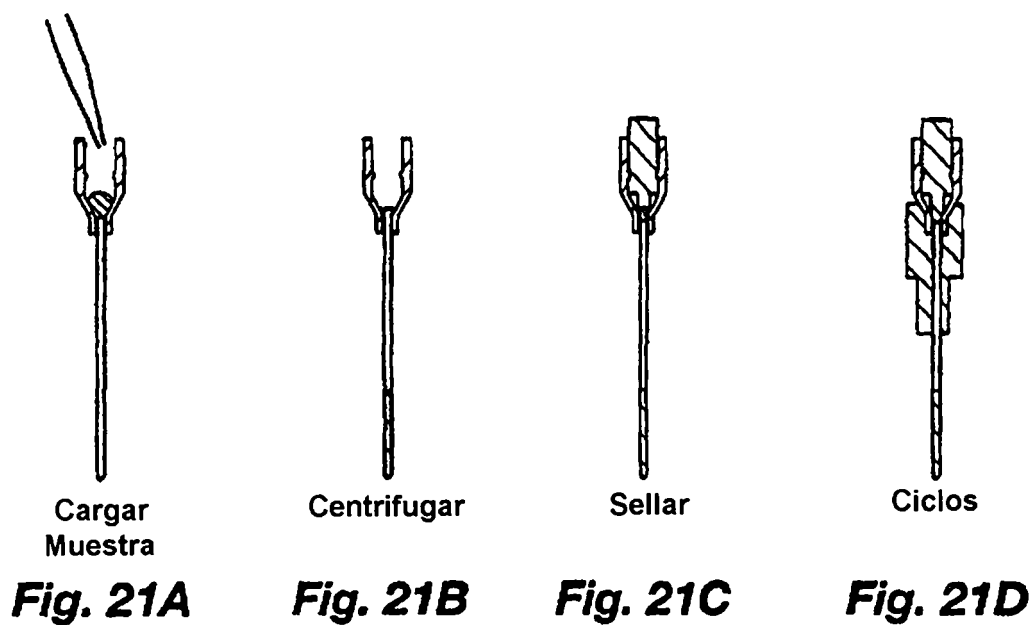


Fig. 22

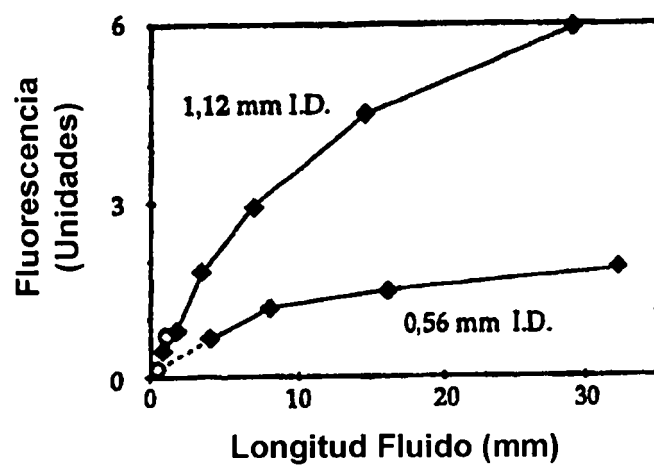


Fig. 22A

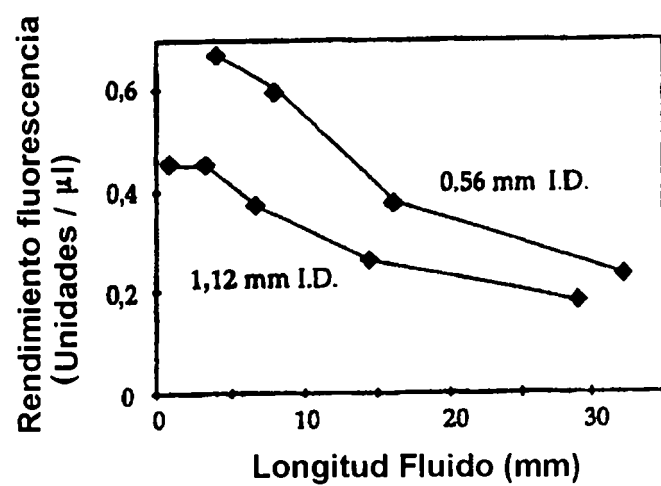


Fig. 22B

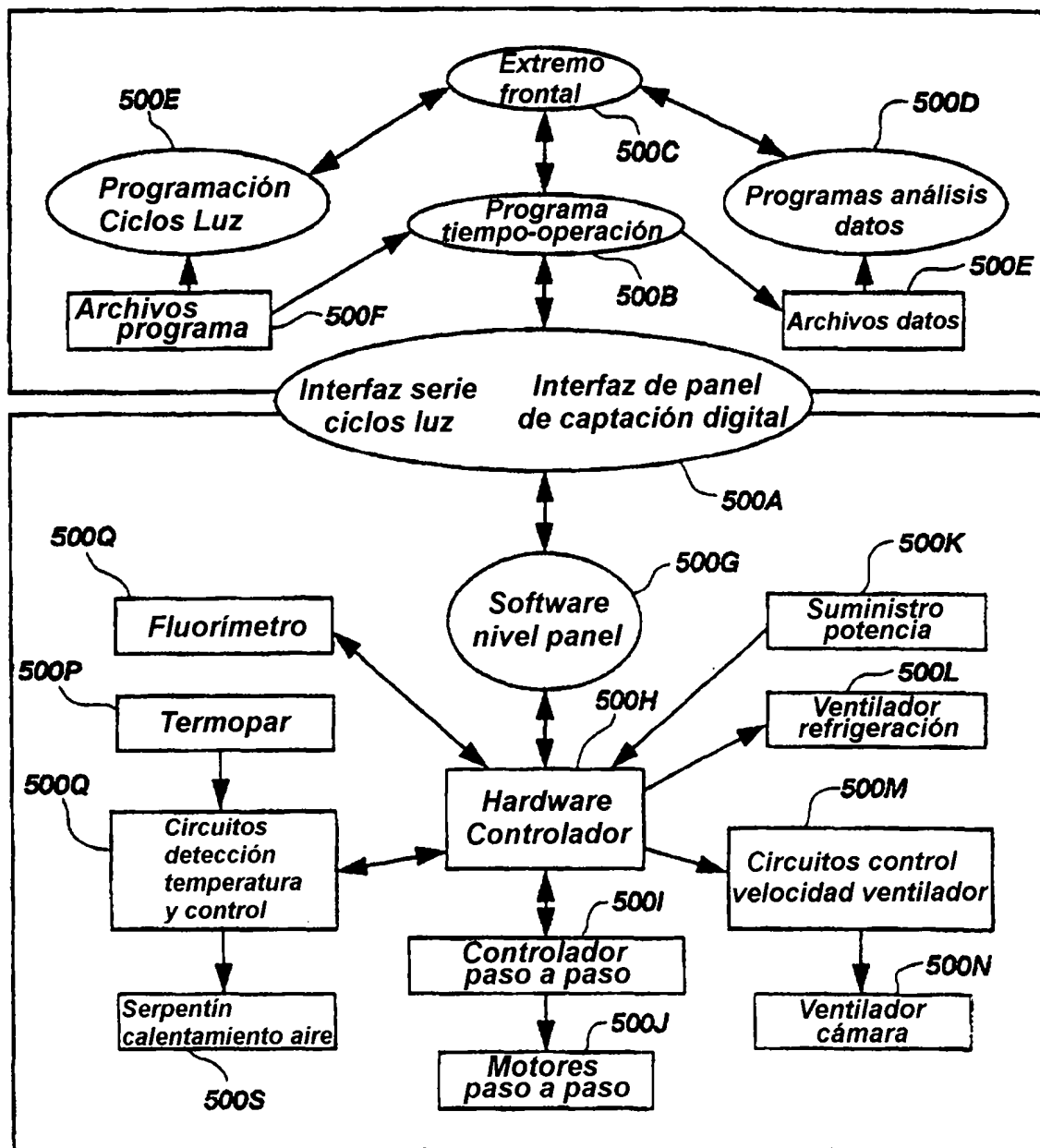


Fig. 22C

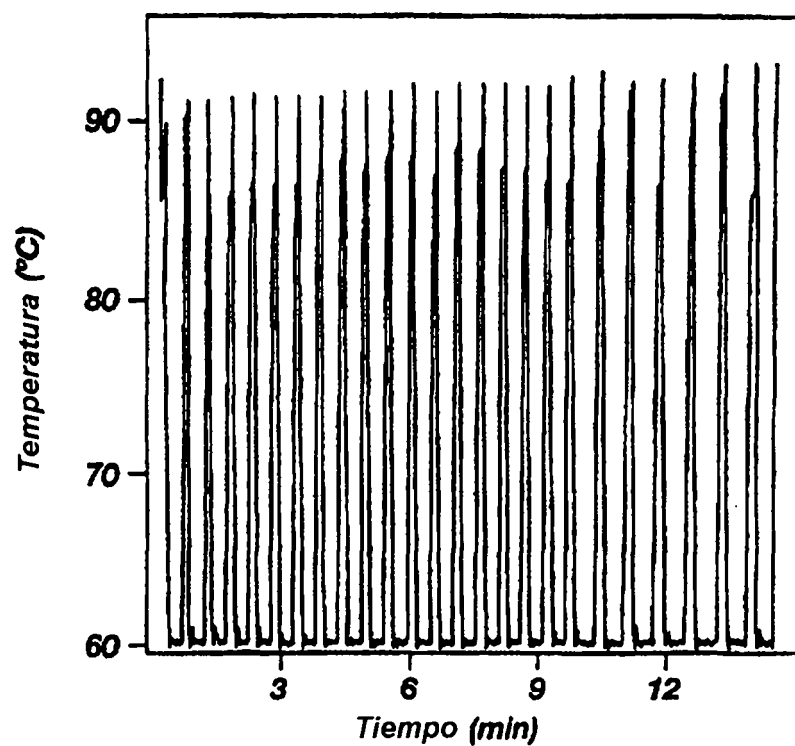


Fig. 22D

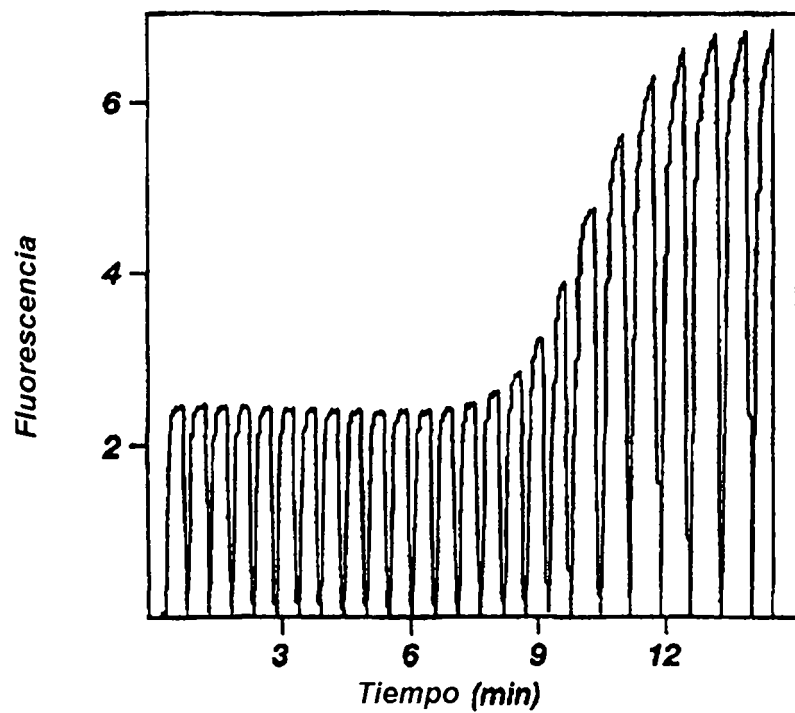


Fig. 22E

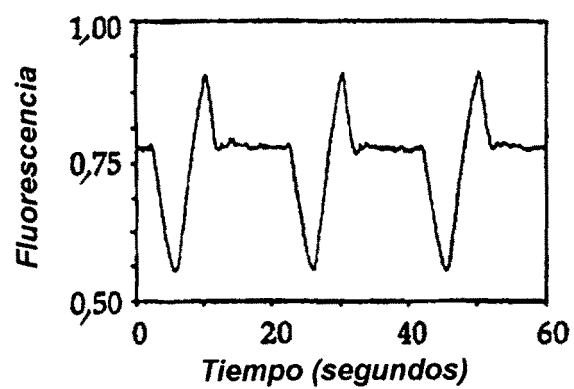


Fig. 23

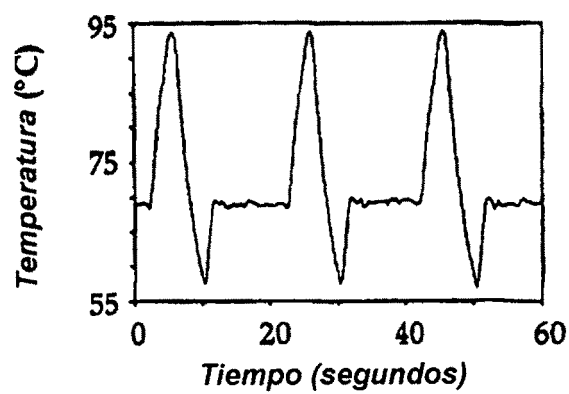


Fig. 24

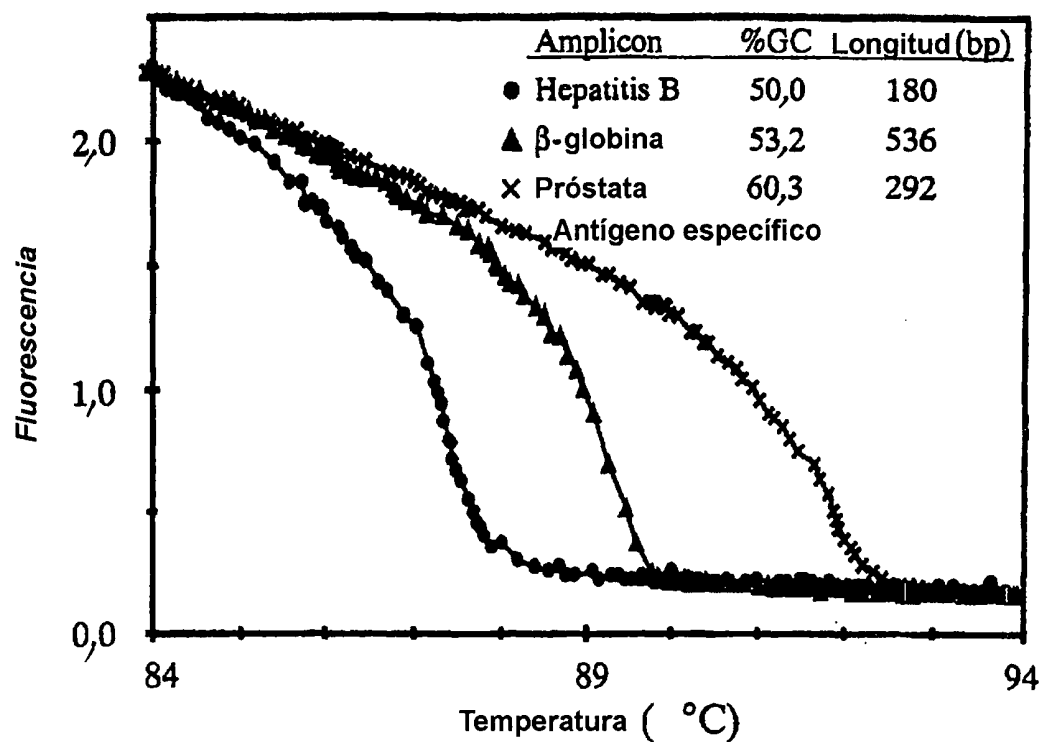


Fig. 25

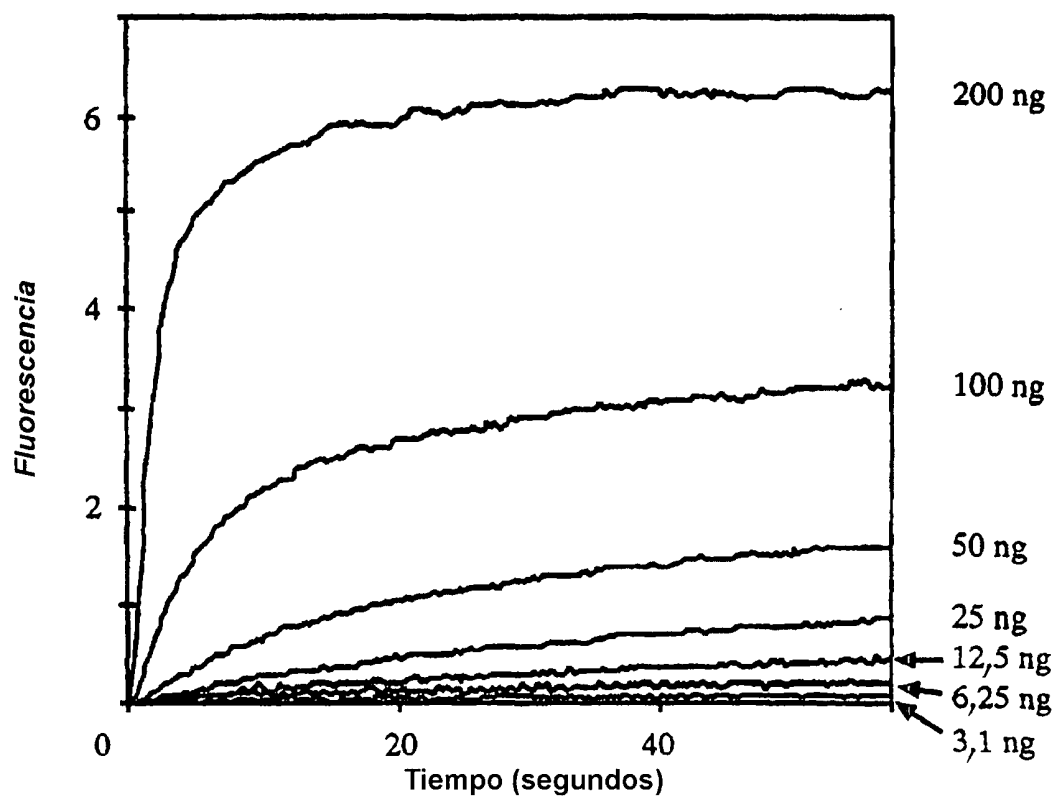


Fig. 26

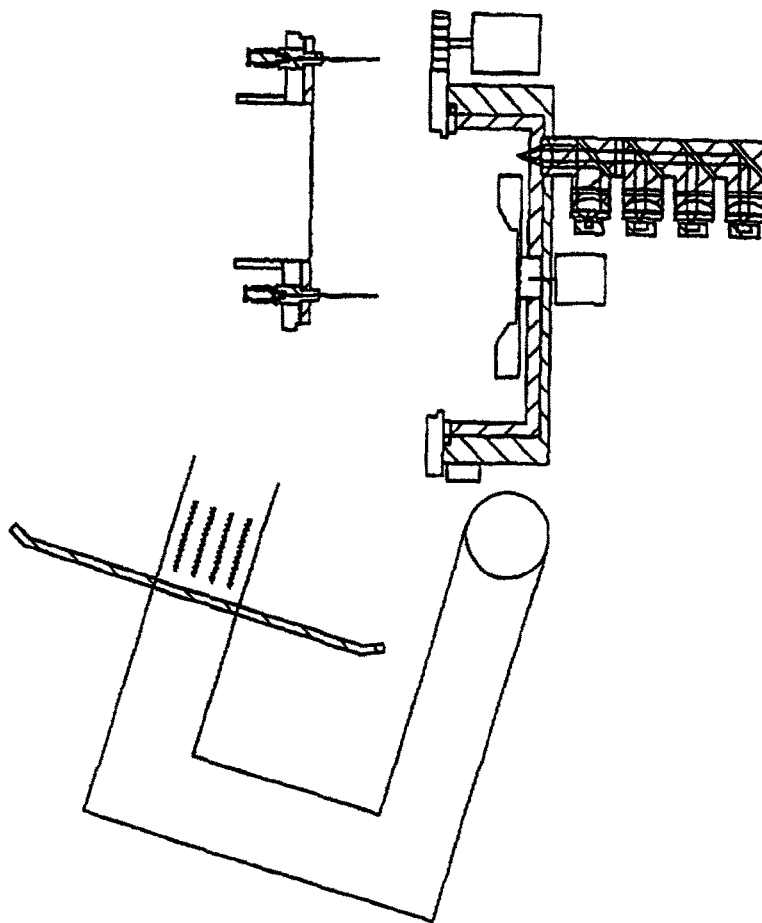


Fig. 27B

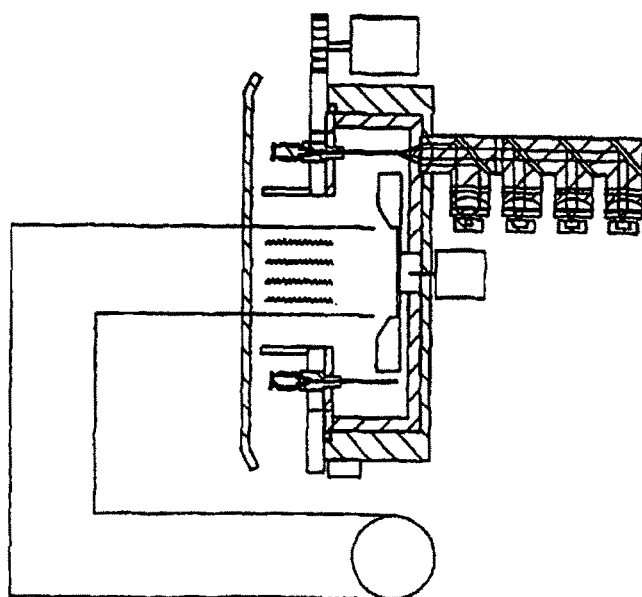
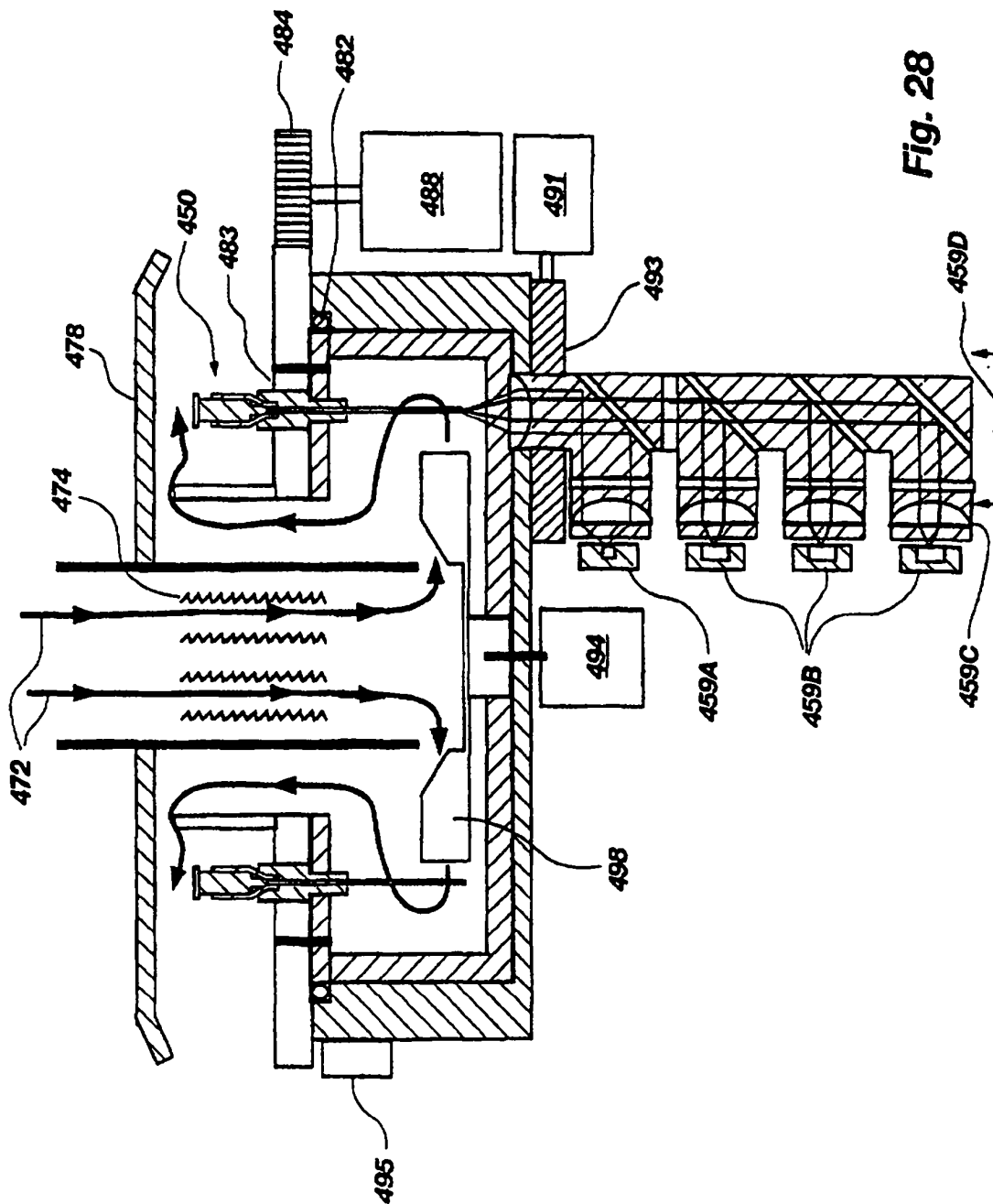


Fig. 27A



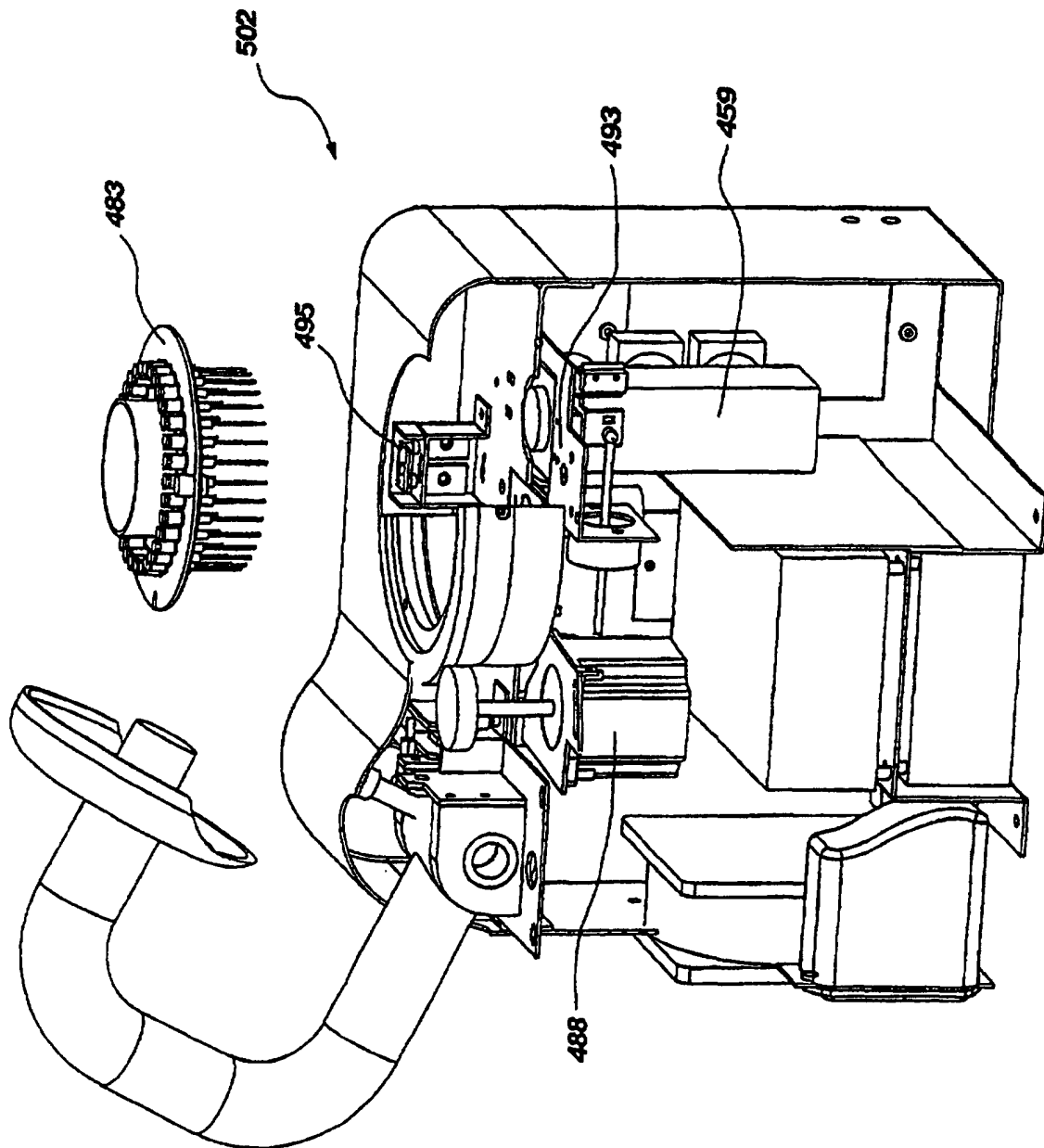


Fig. 29

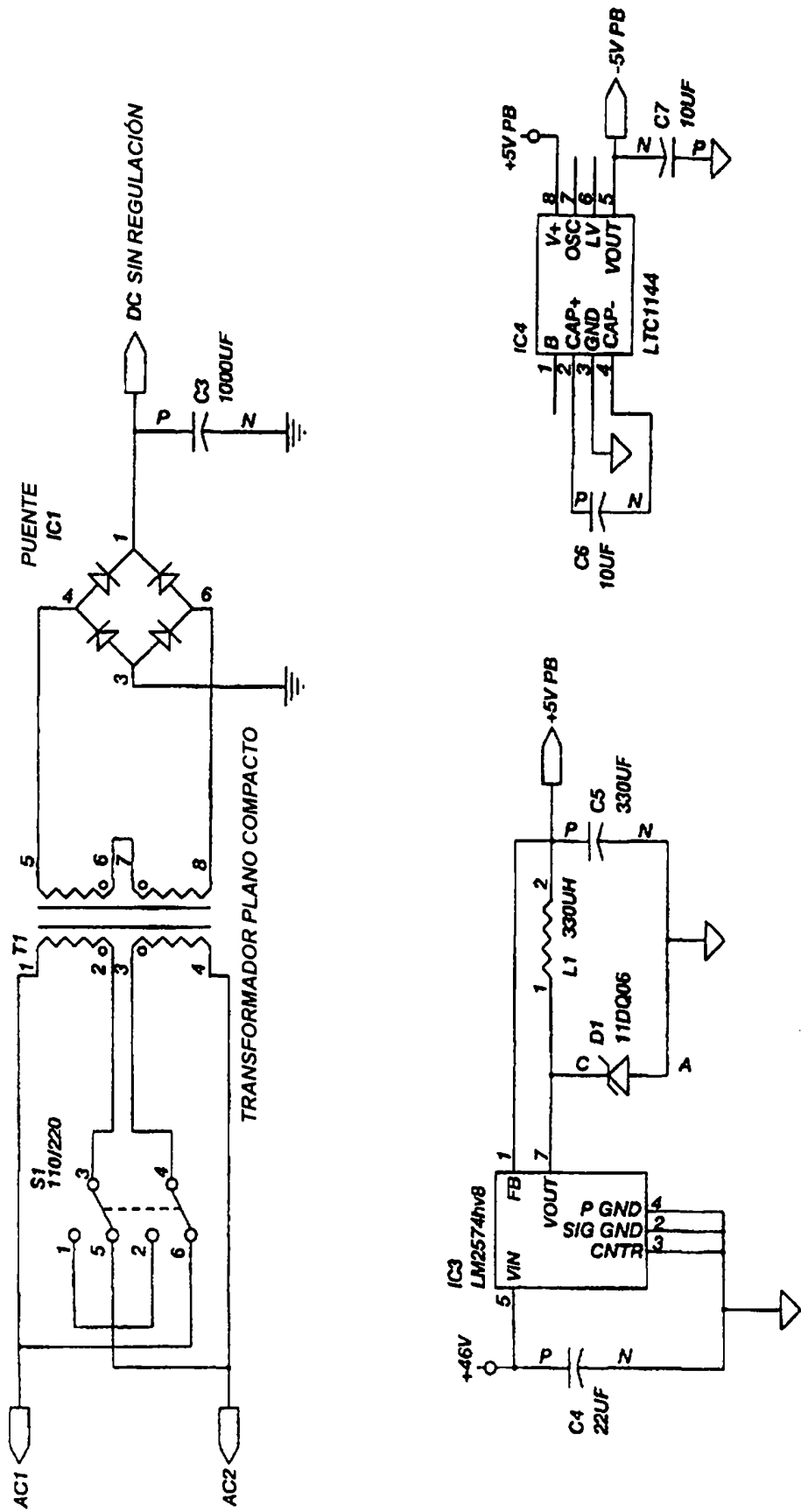


Fig. 30A

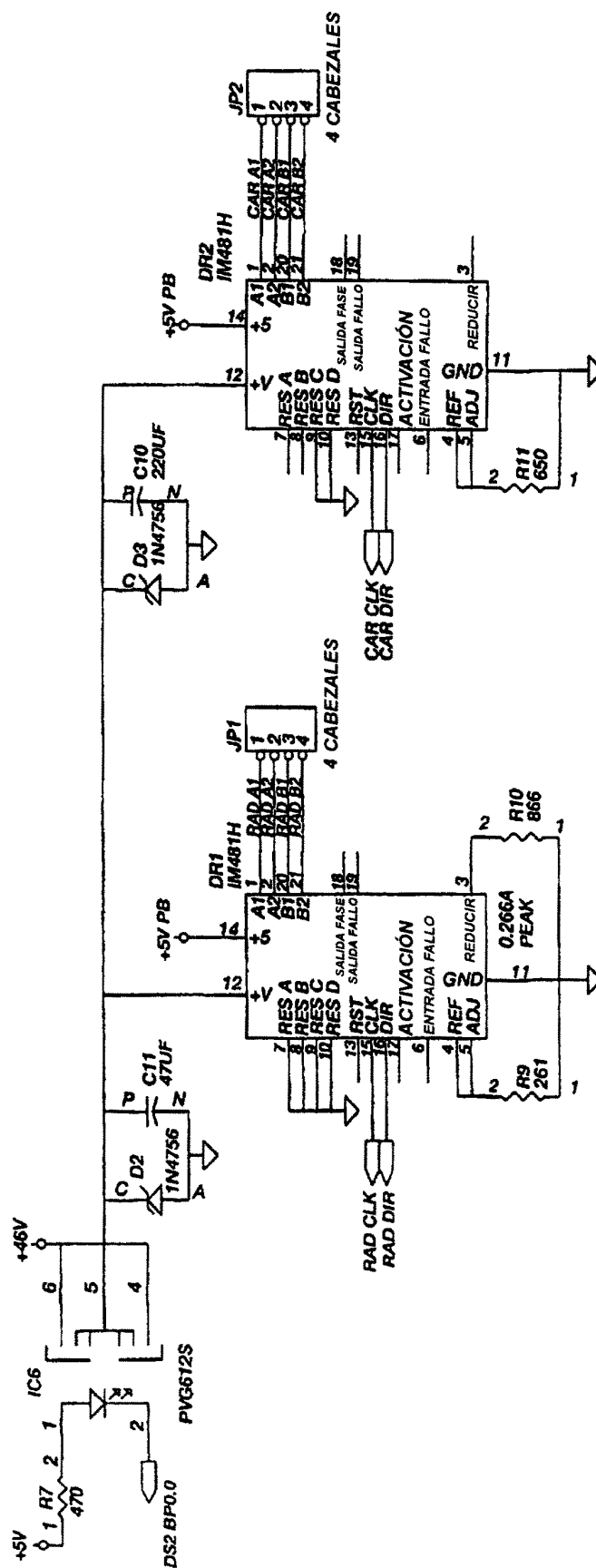


Fig. 30B

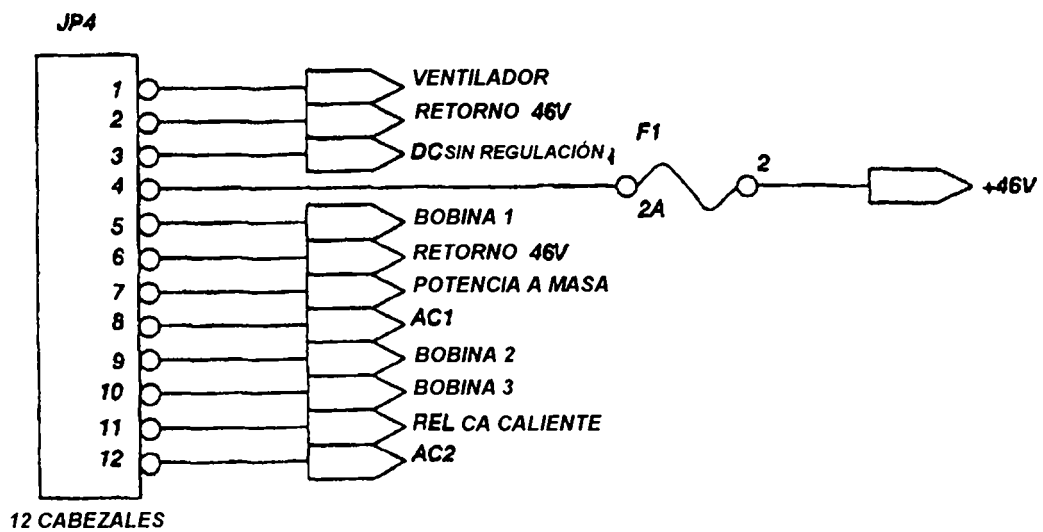
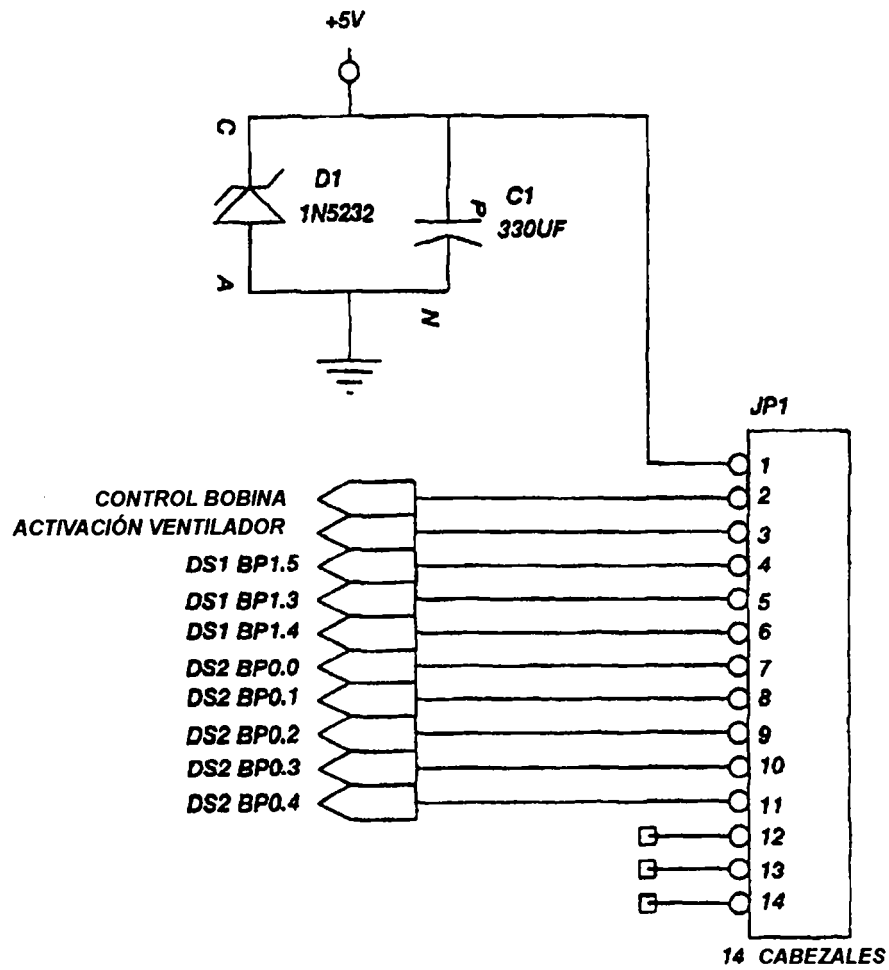


Fig. 30C

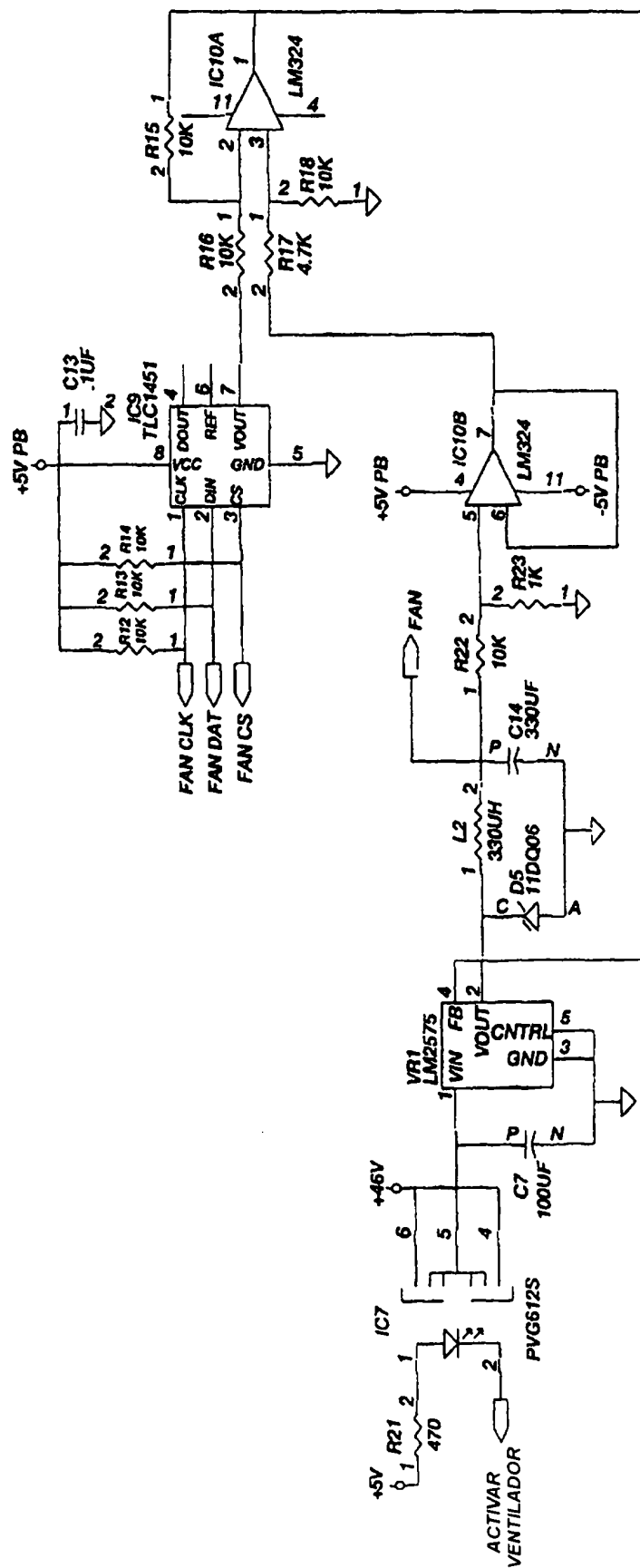


Fig. 30D

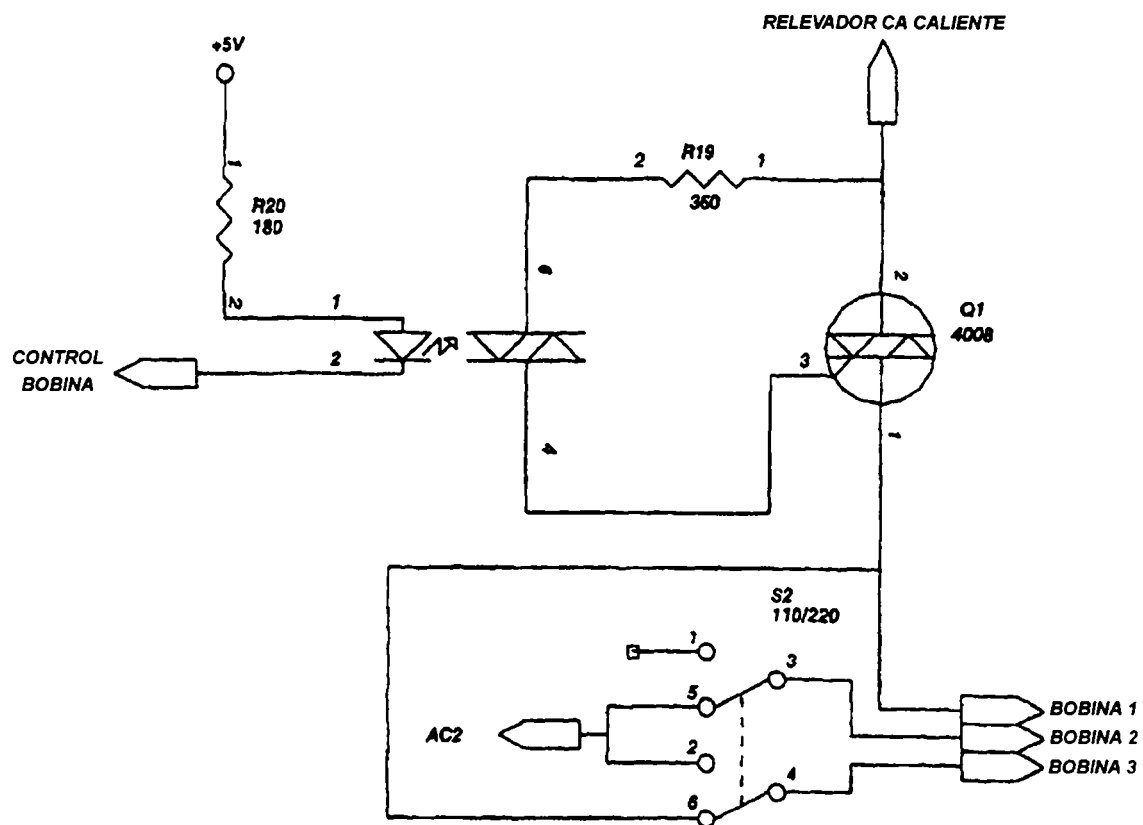


Fig. 30E

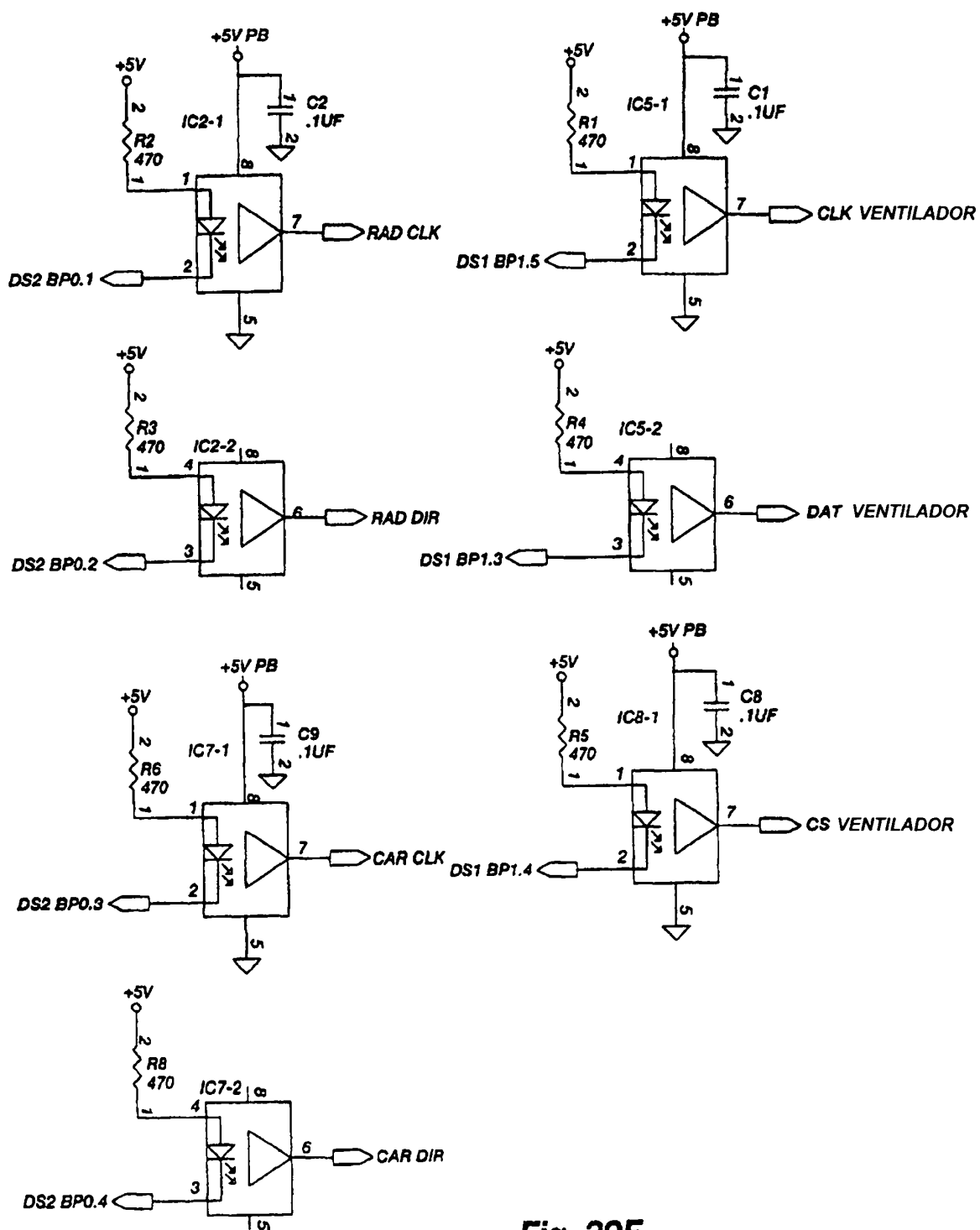


Fig. 30F

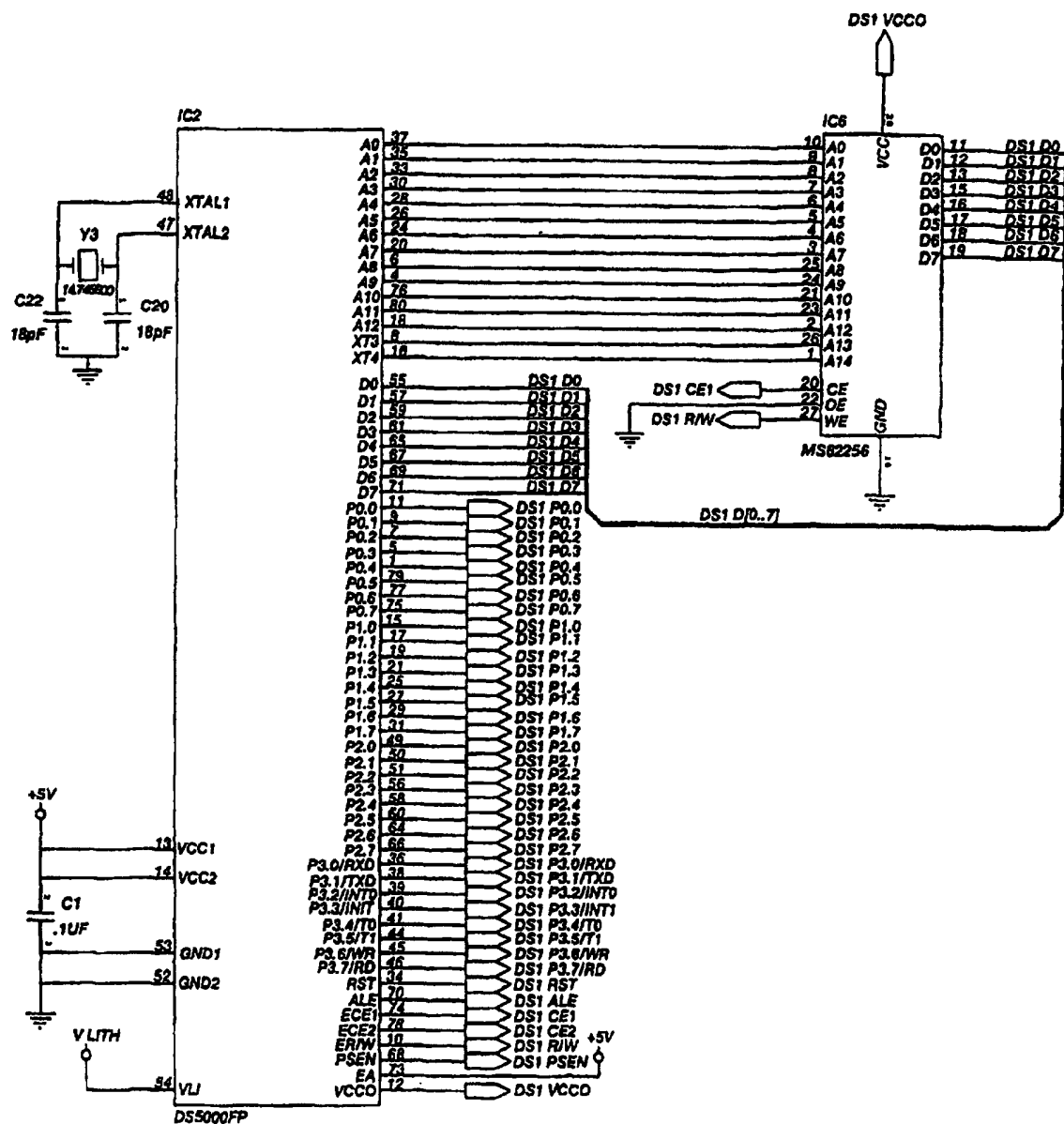


Fig. 30G

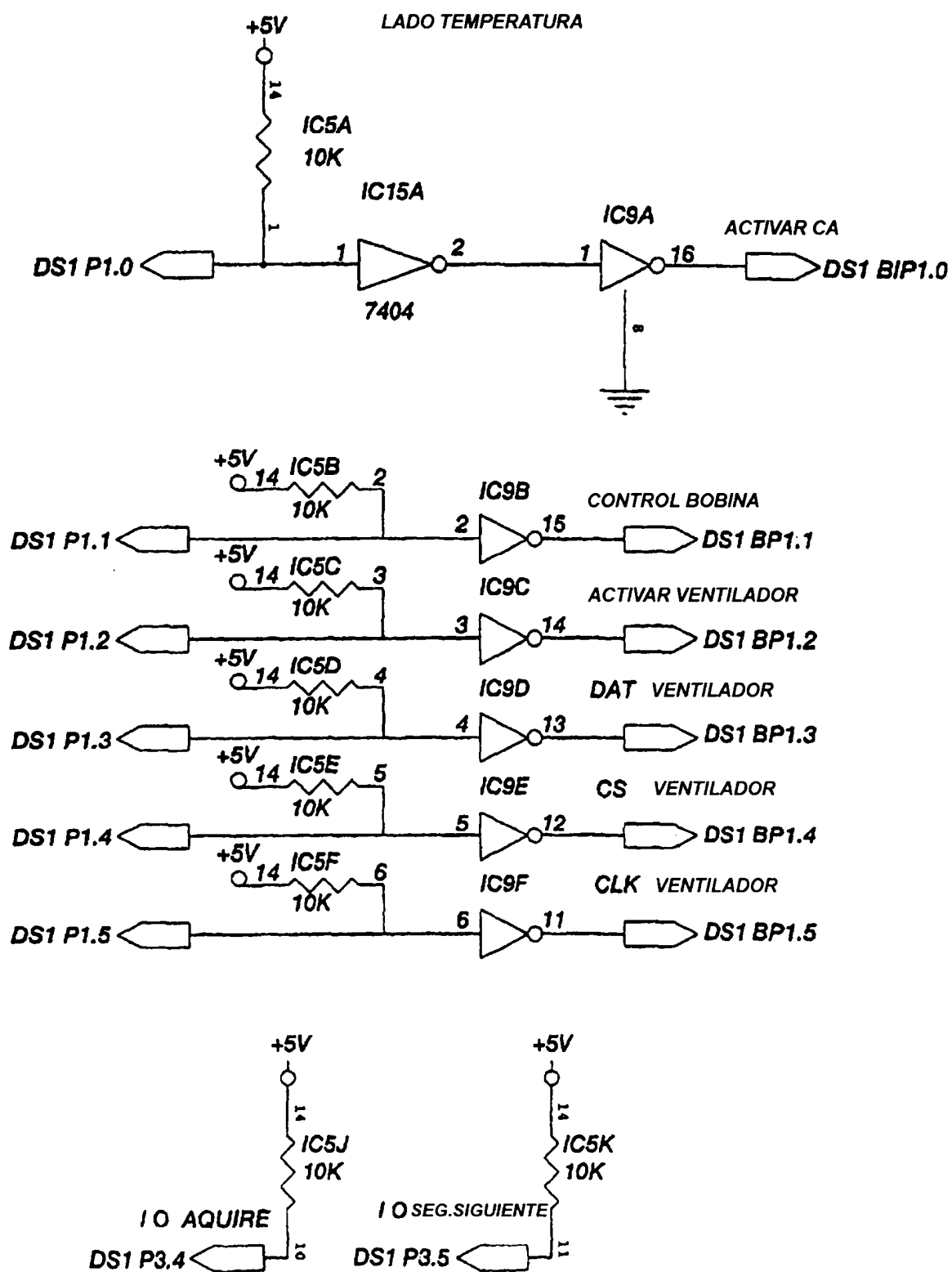


Fig. 30H

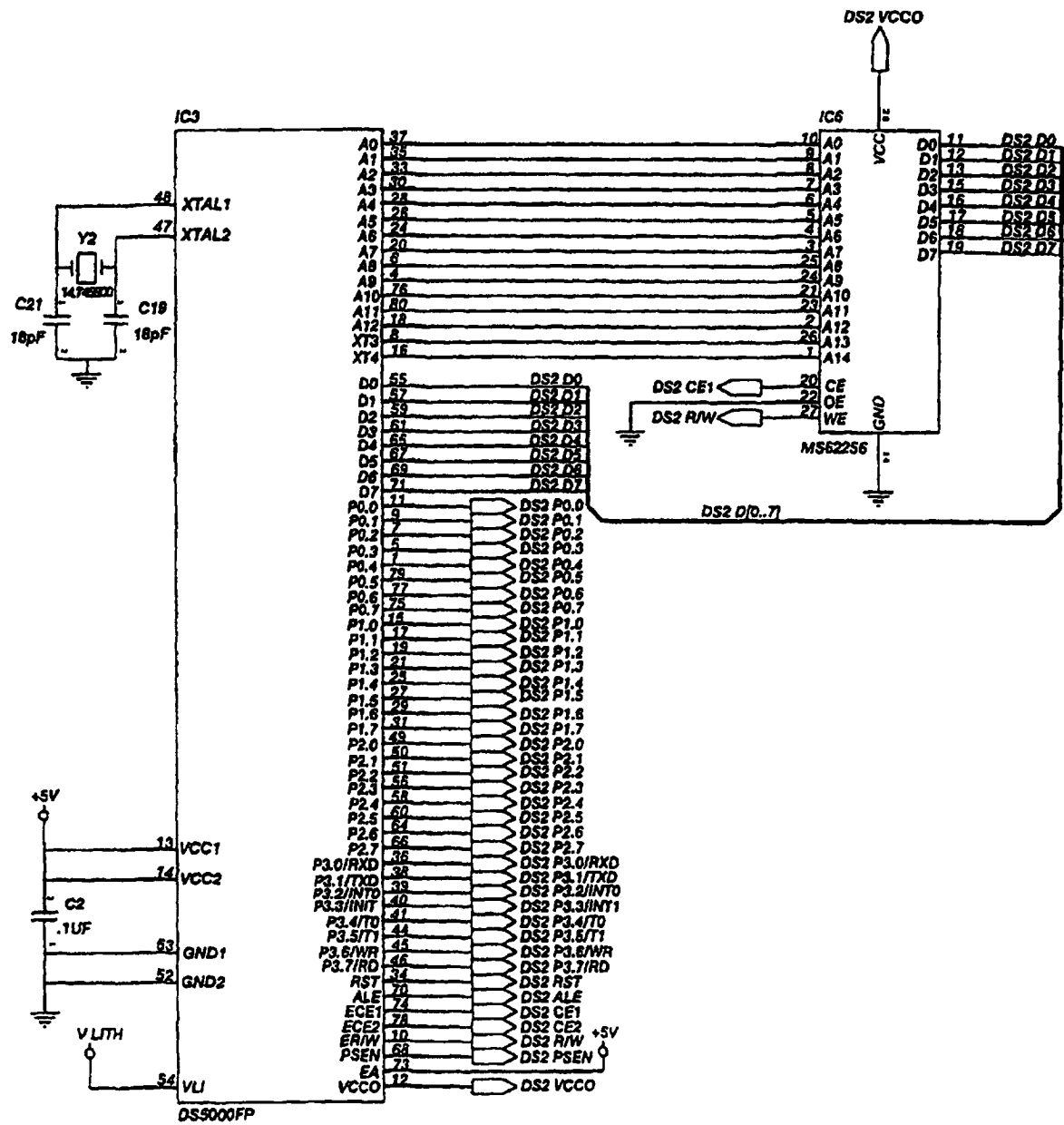


Fig. 30I

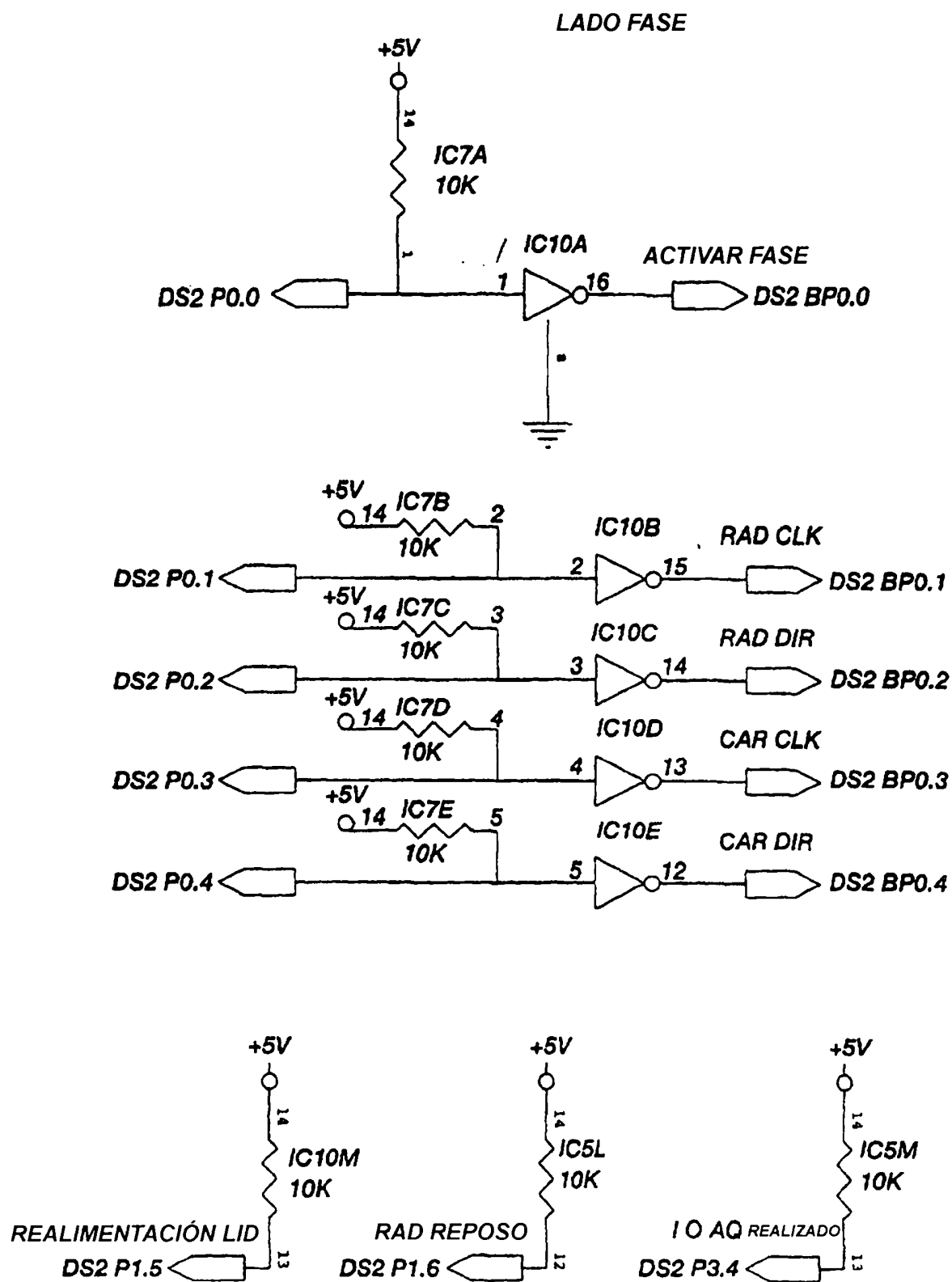


Fig. 30J

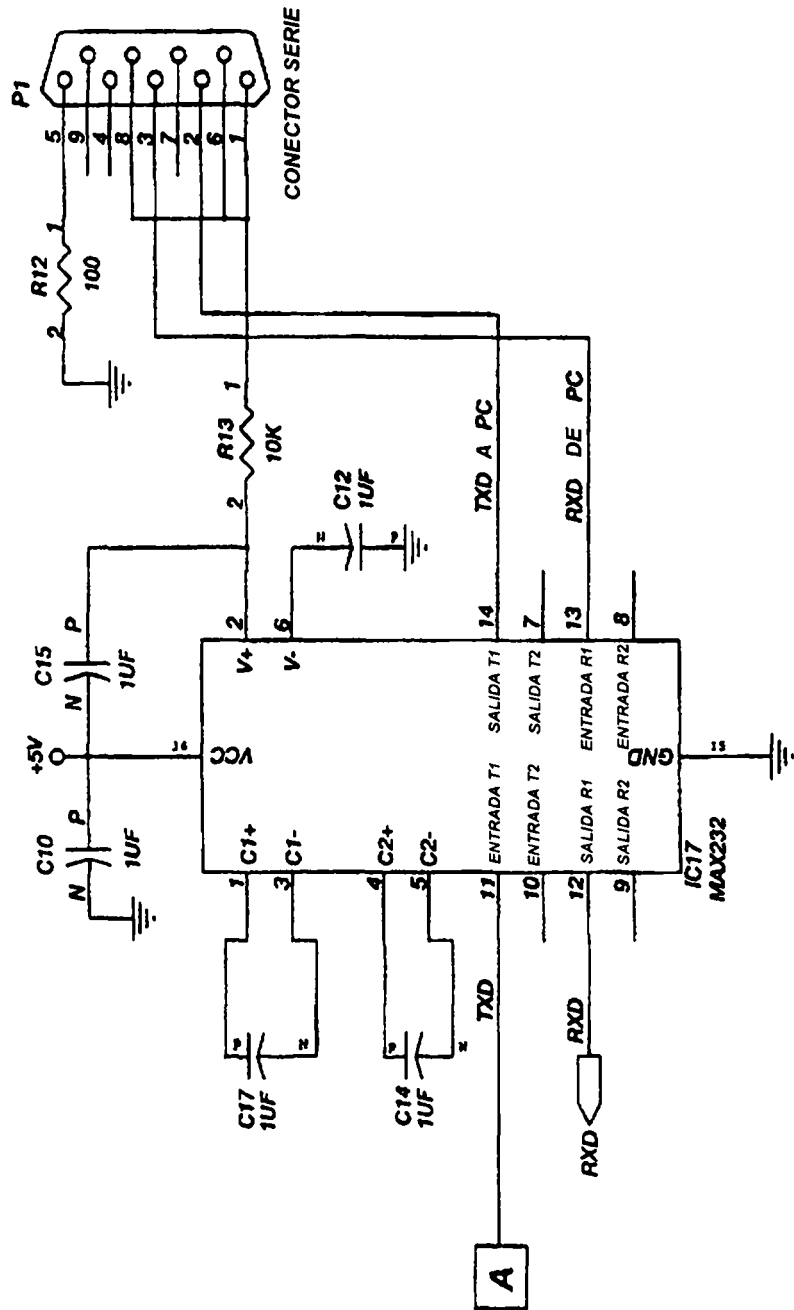


Fig. 30K

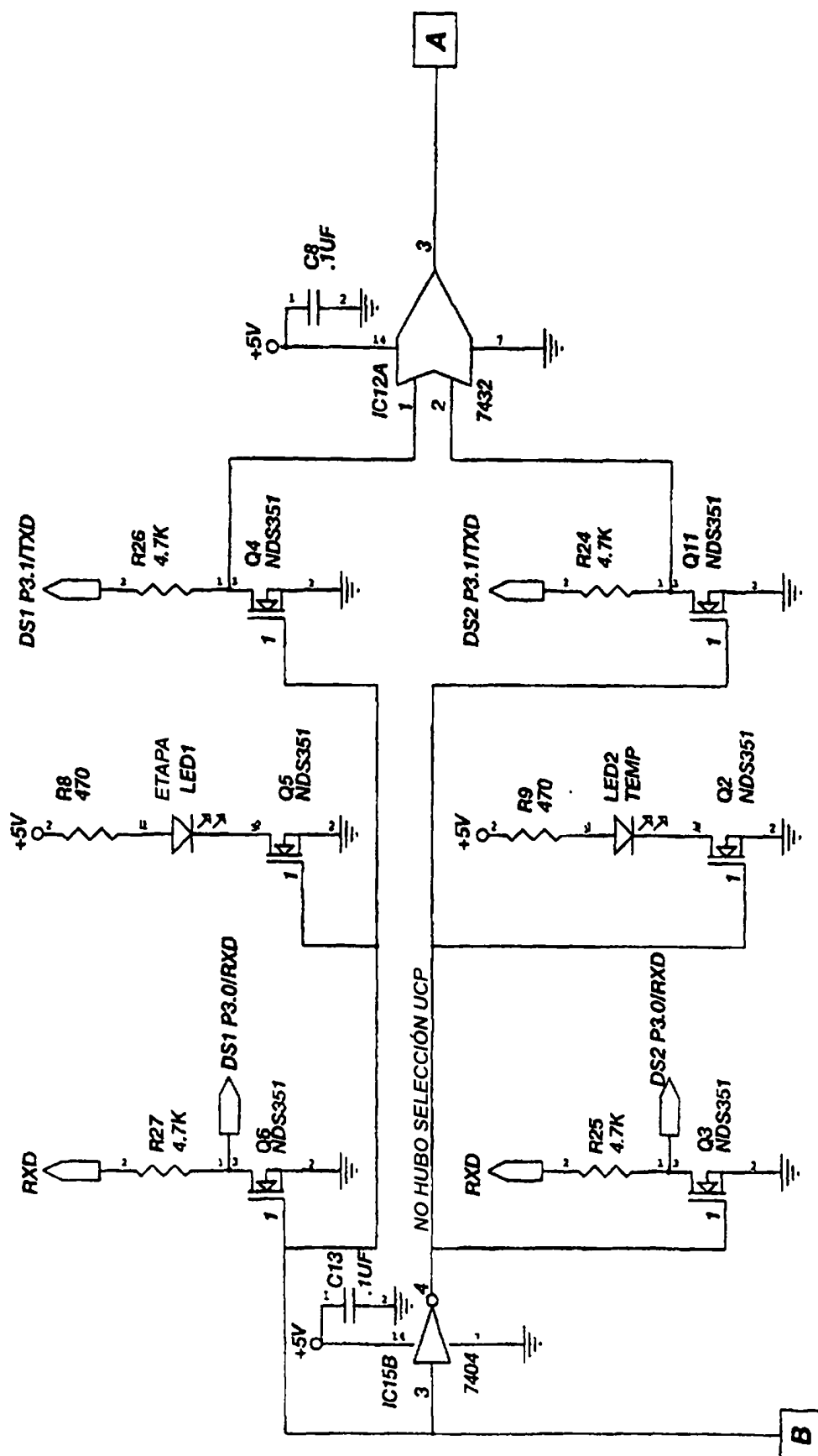


Fig. 30L

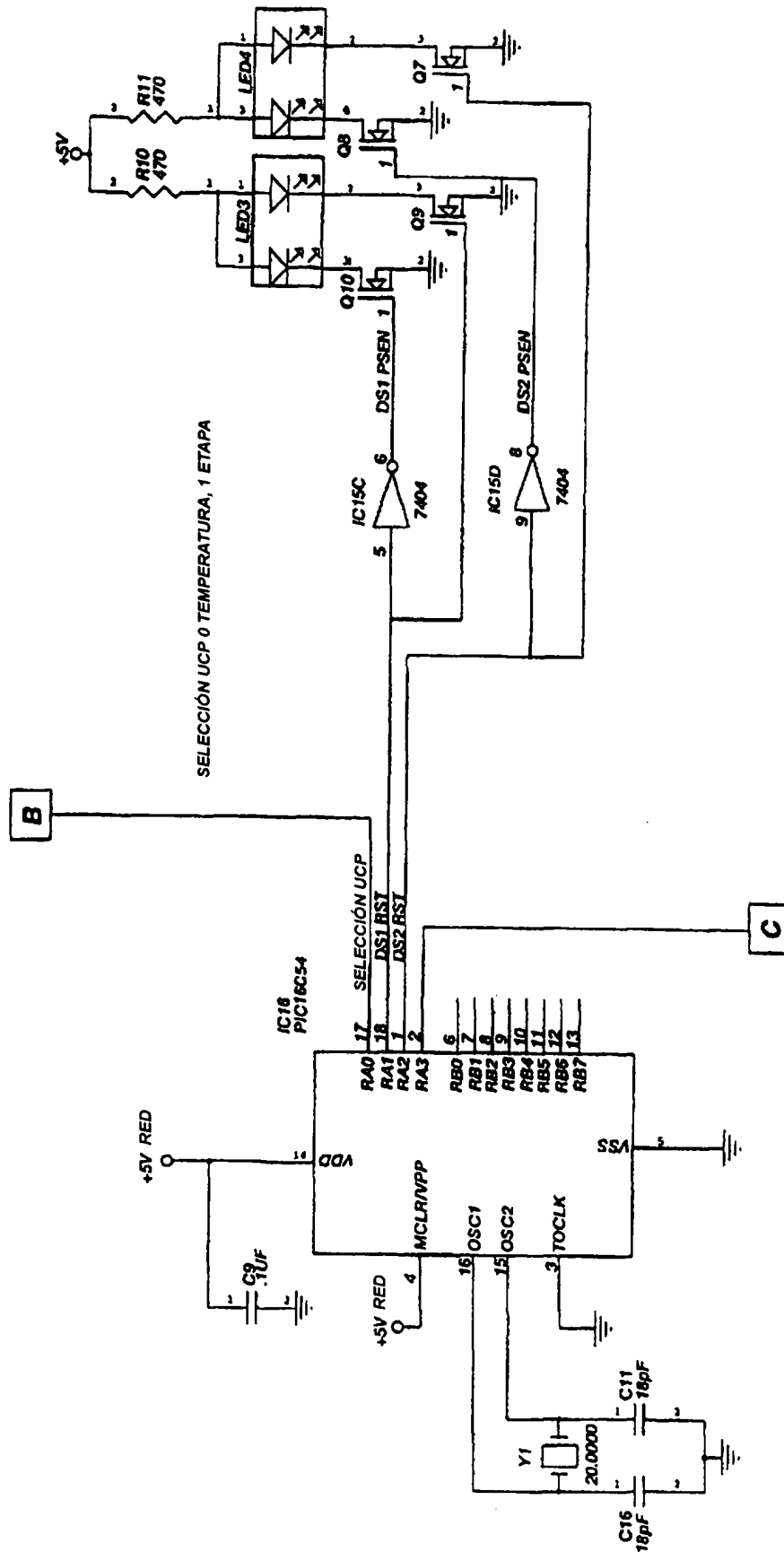


Fig. 30M

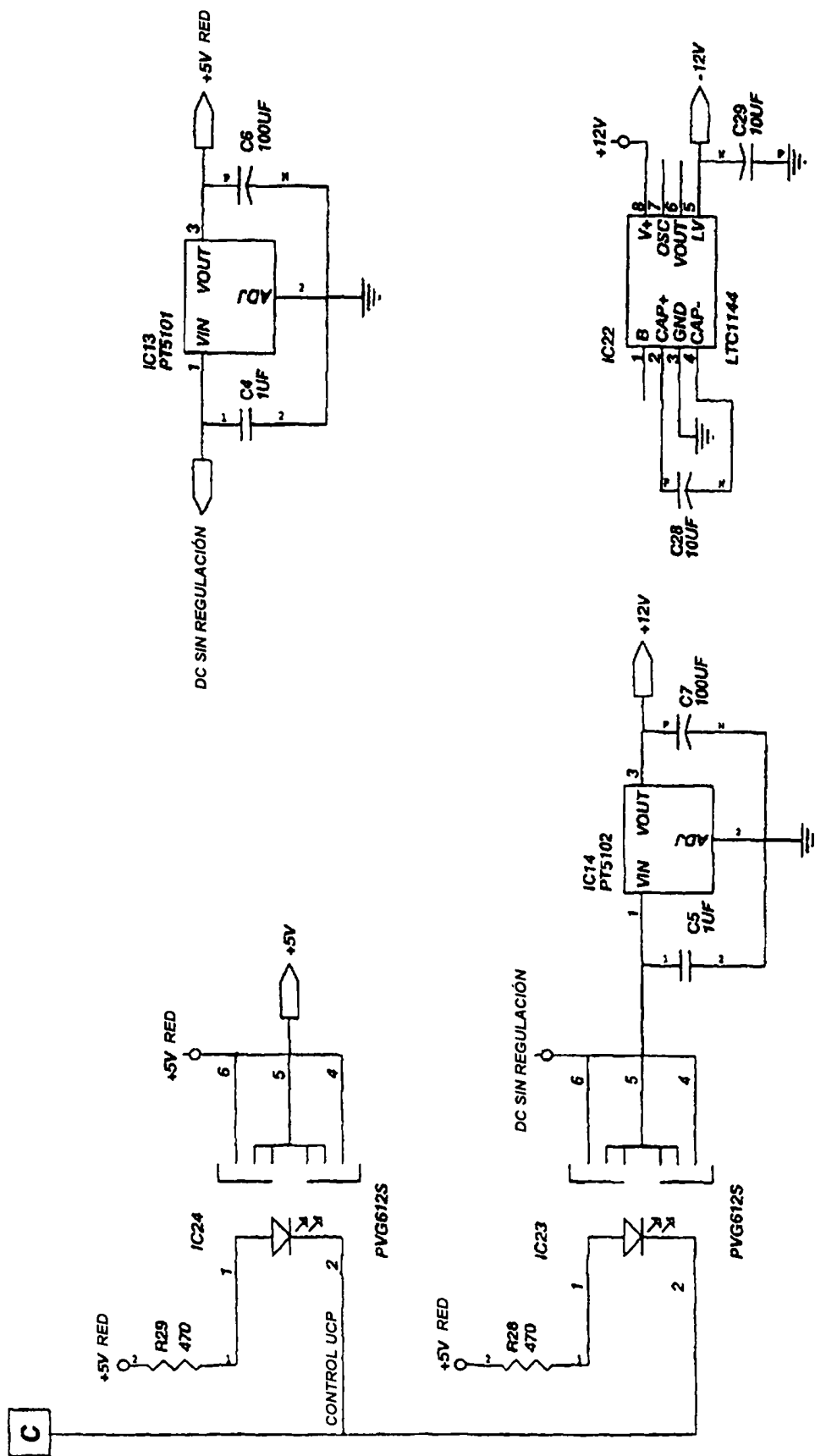


Fig. 30N

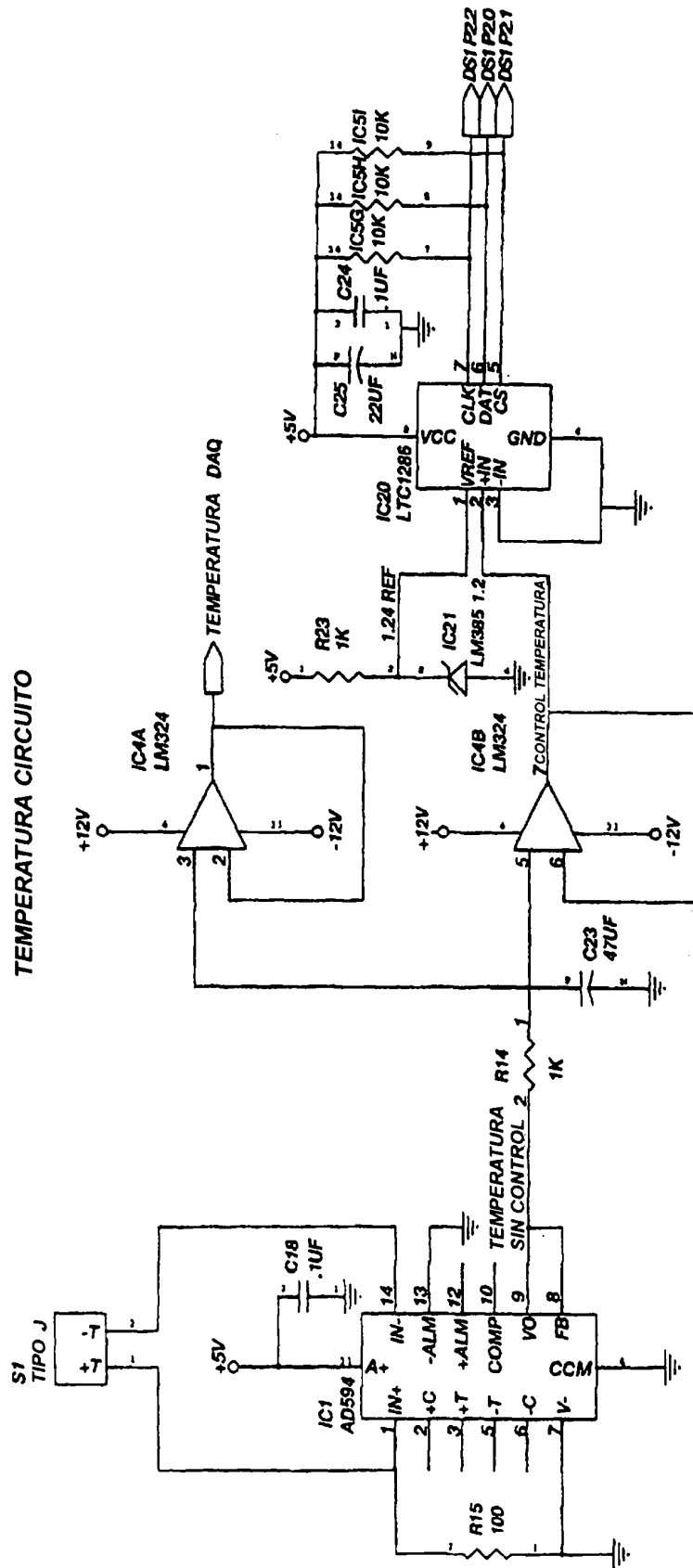


Fig. 300

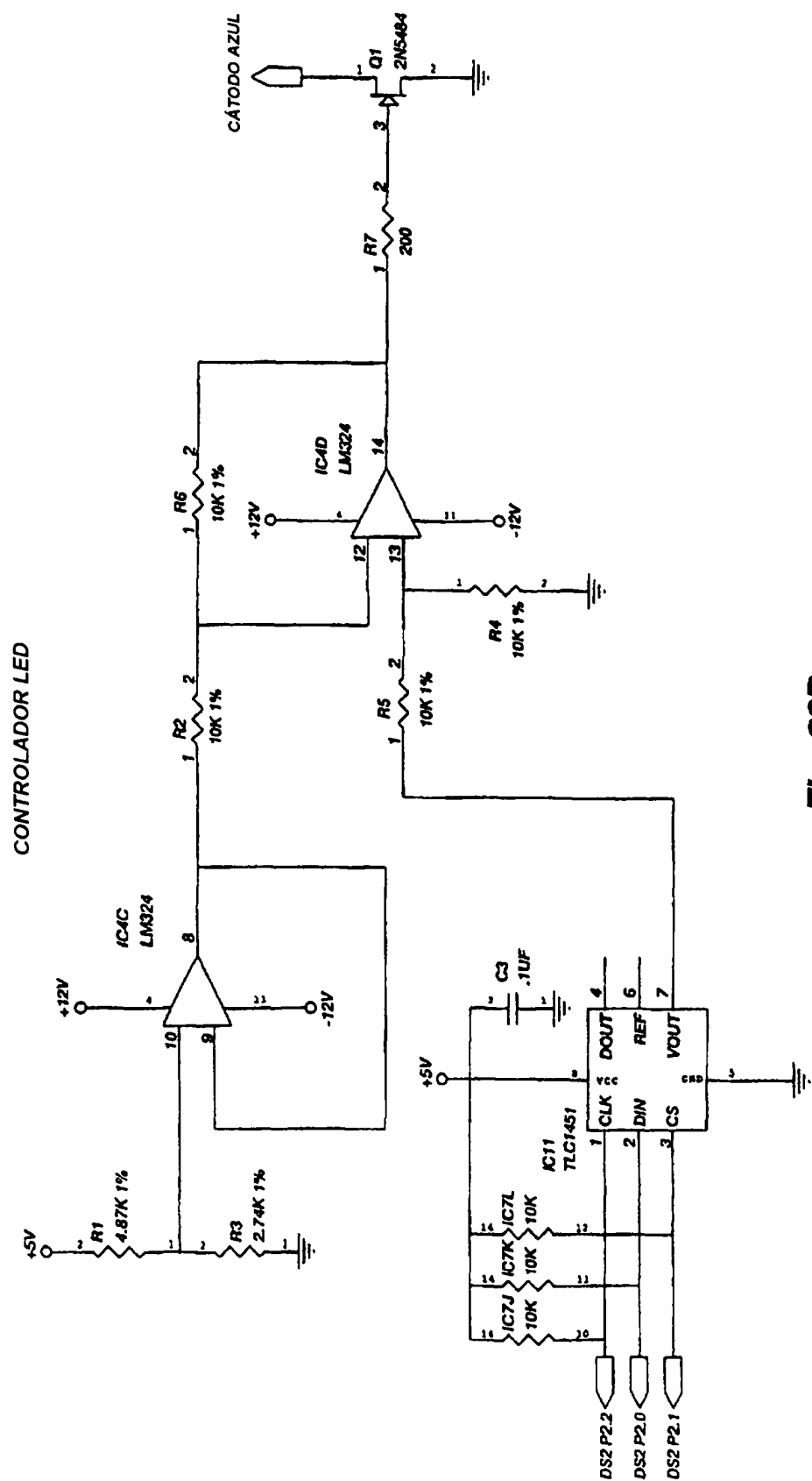


Fig. 30P

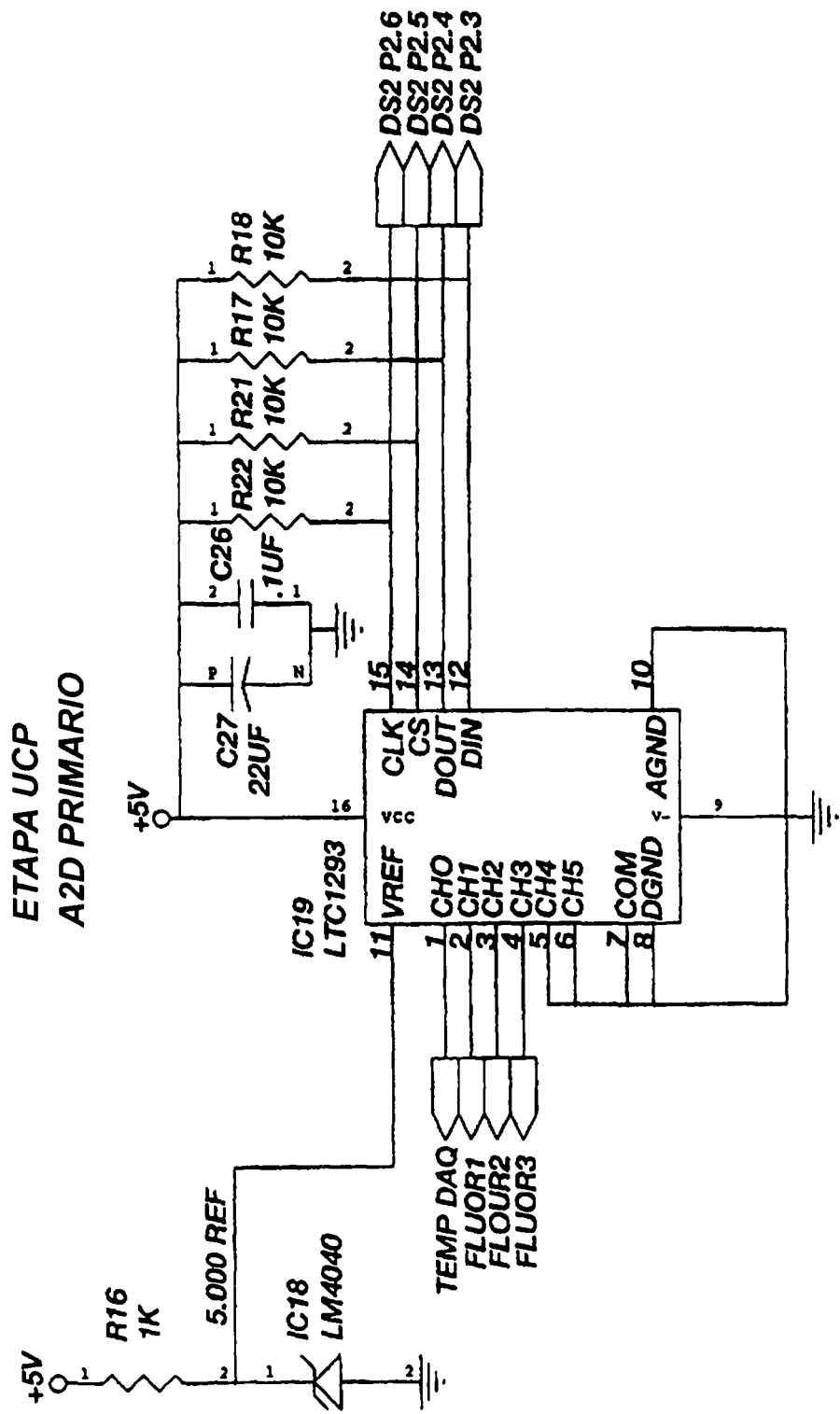


Fig. 30Q

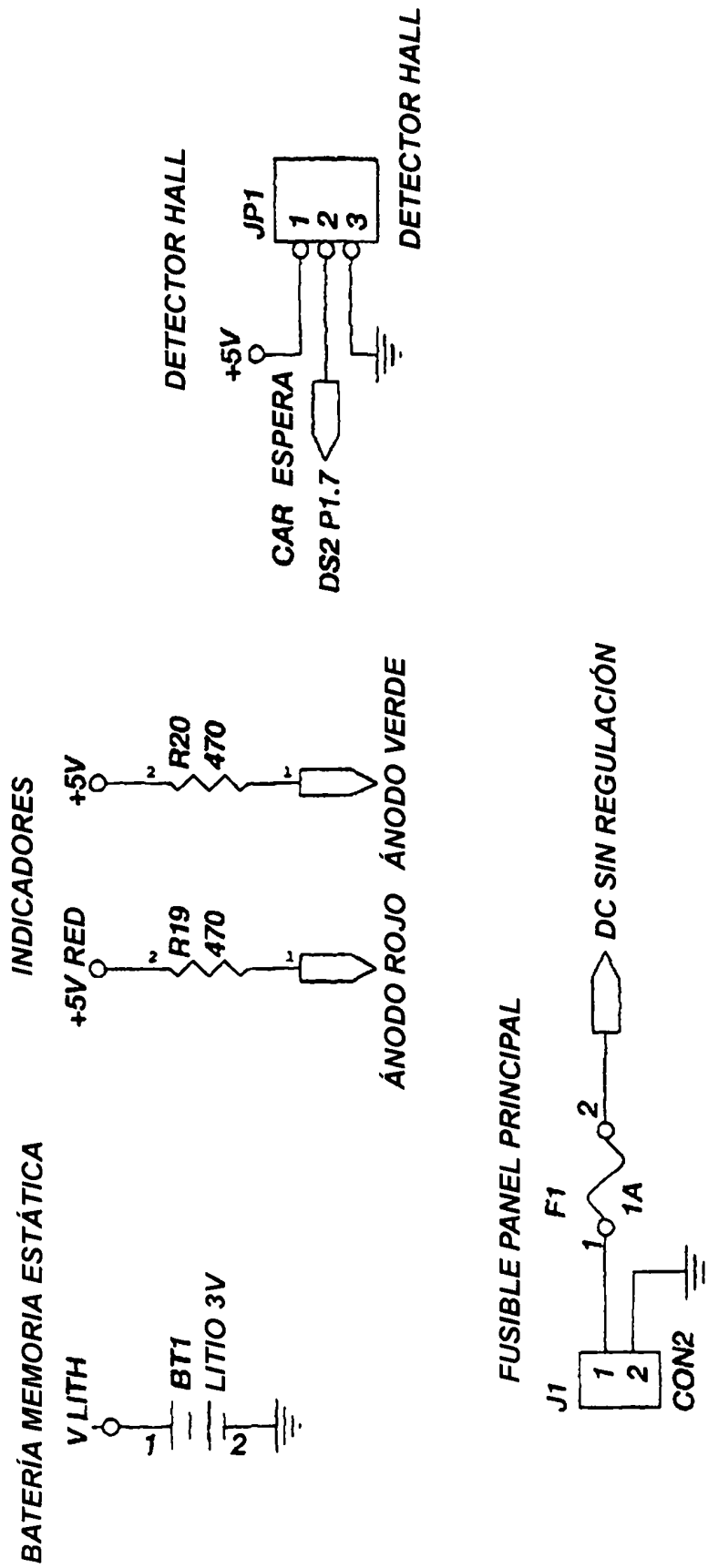


Fig. 30R

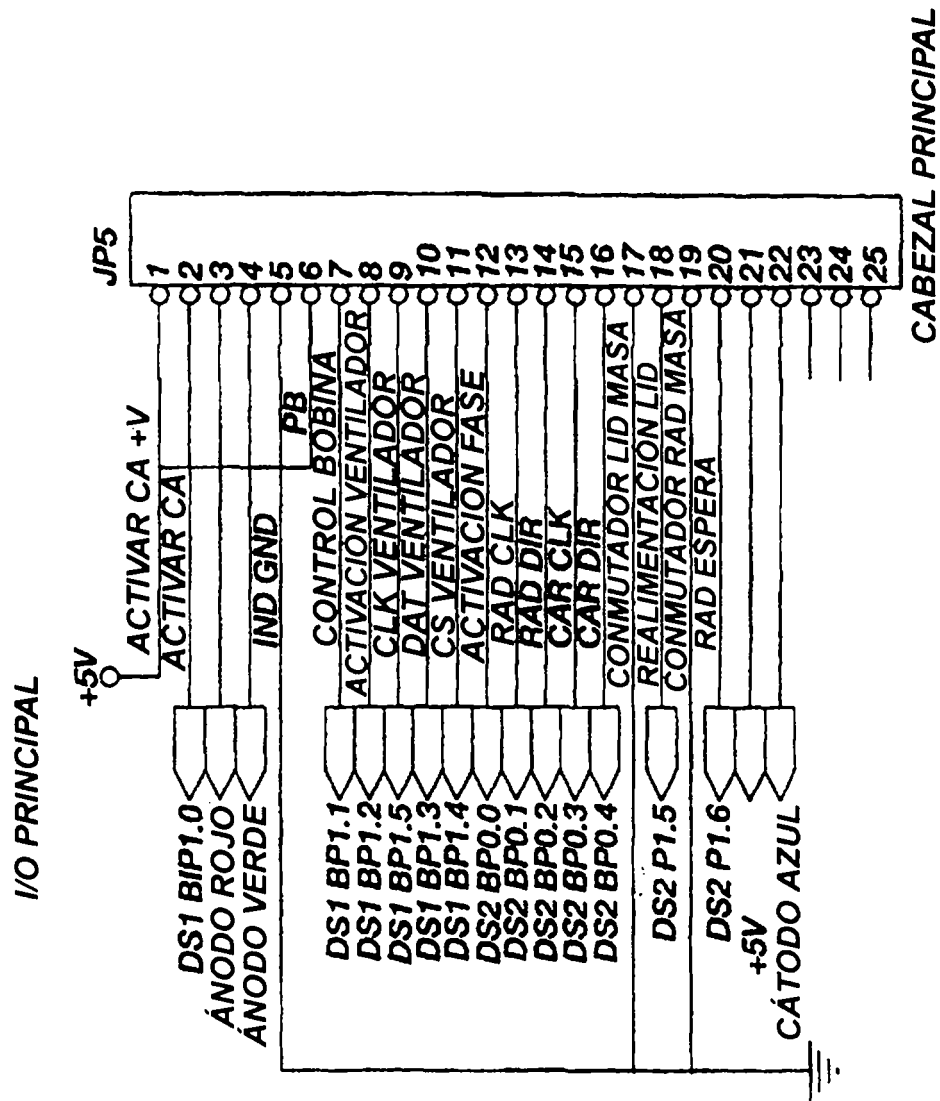


Fig. 30S

I/O FLUORÍMETRO

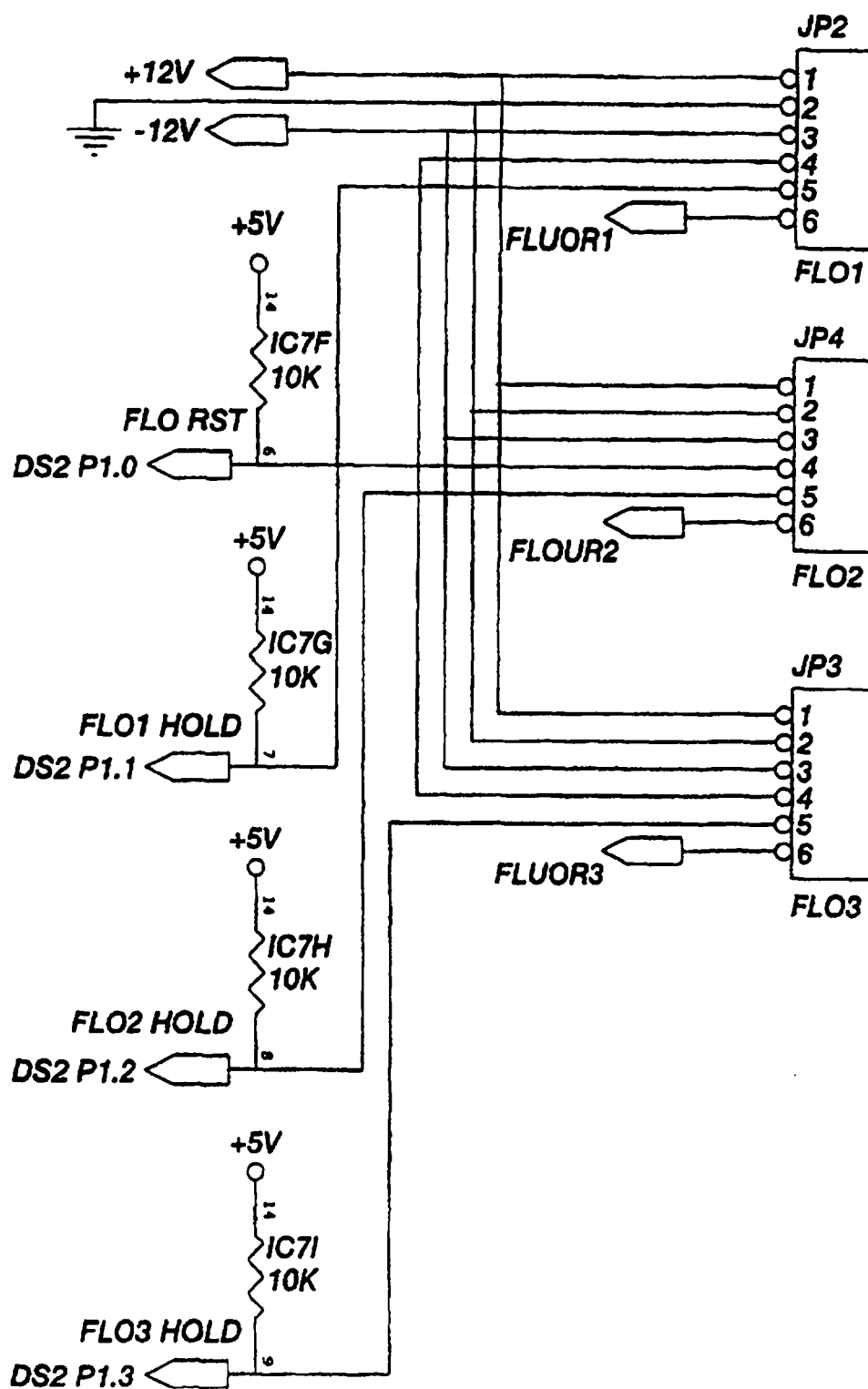


Fig. 30T

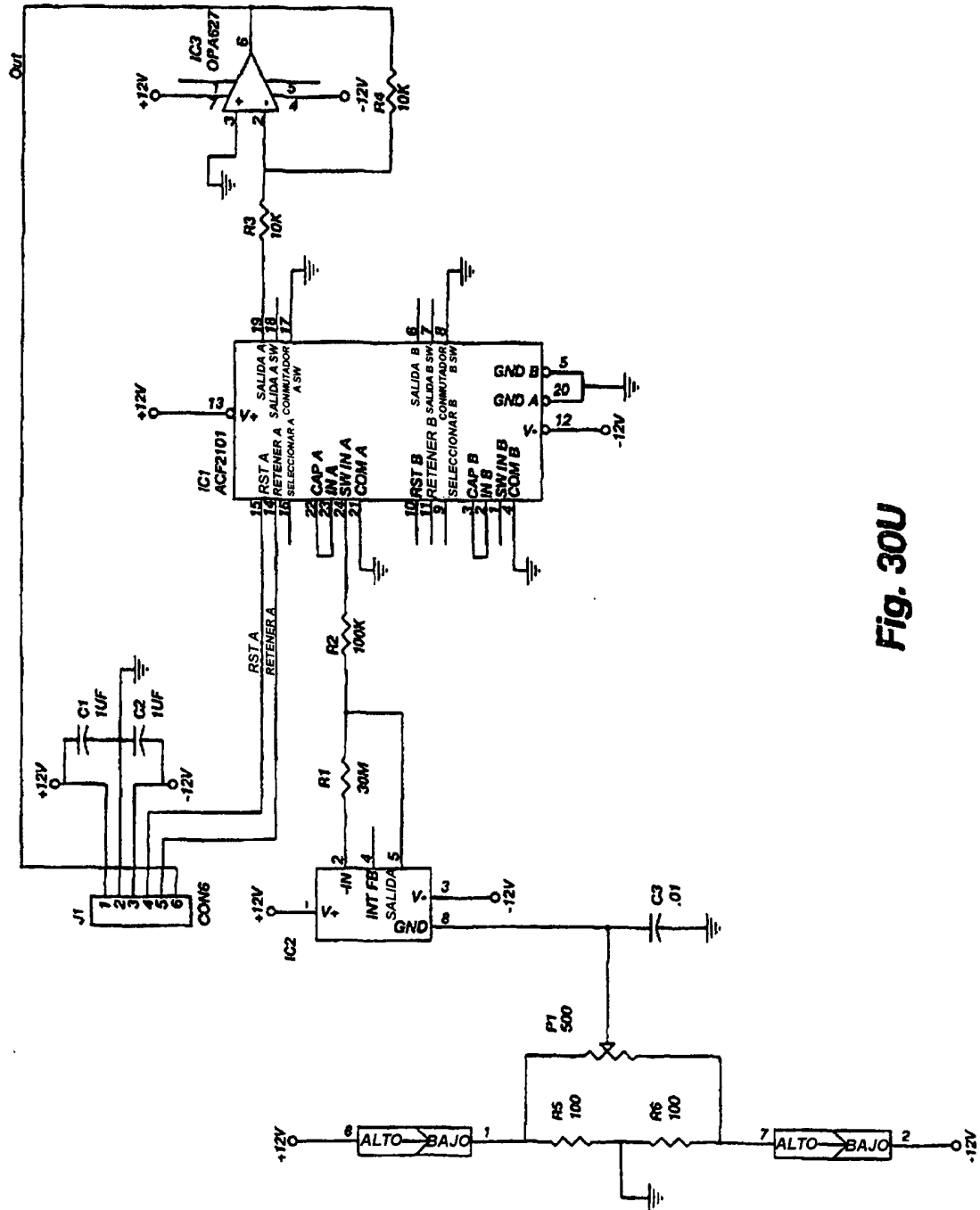


Fig. 30U

SENSOR POSICIÓN REPOSO CARRUSEL

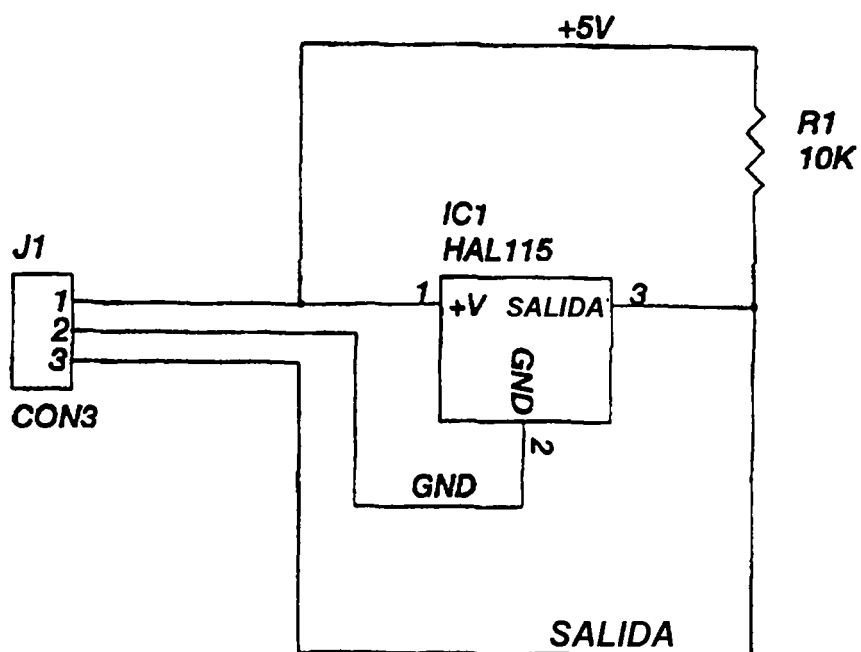


Fig. 30V

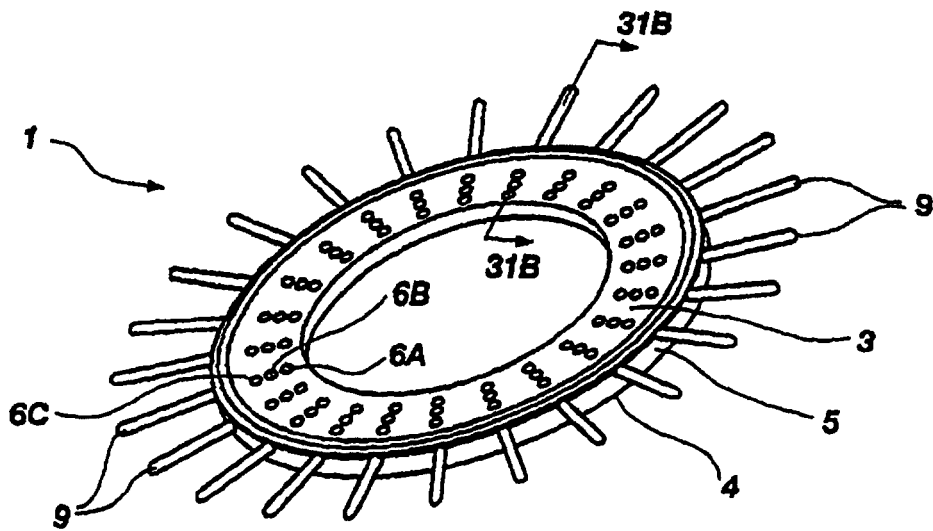


Fig. 31A

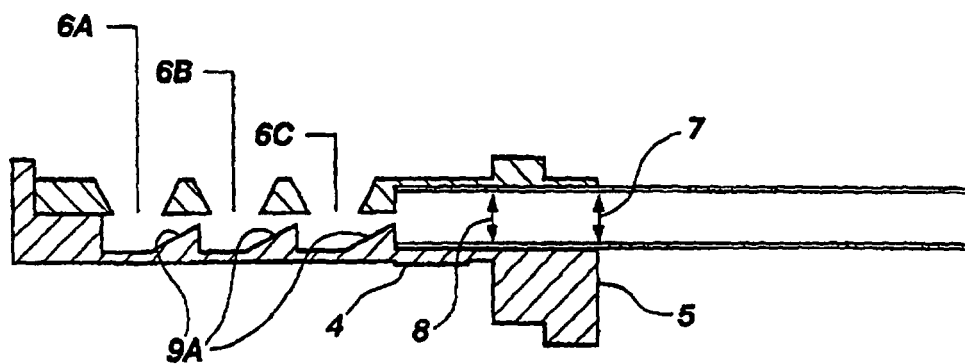


Fig. 31B

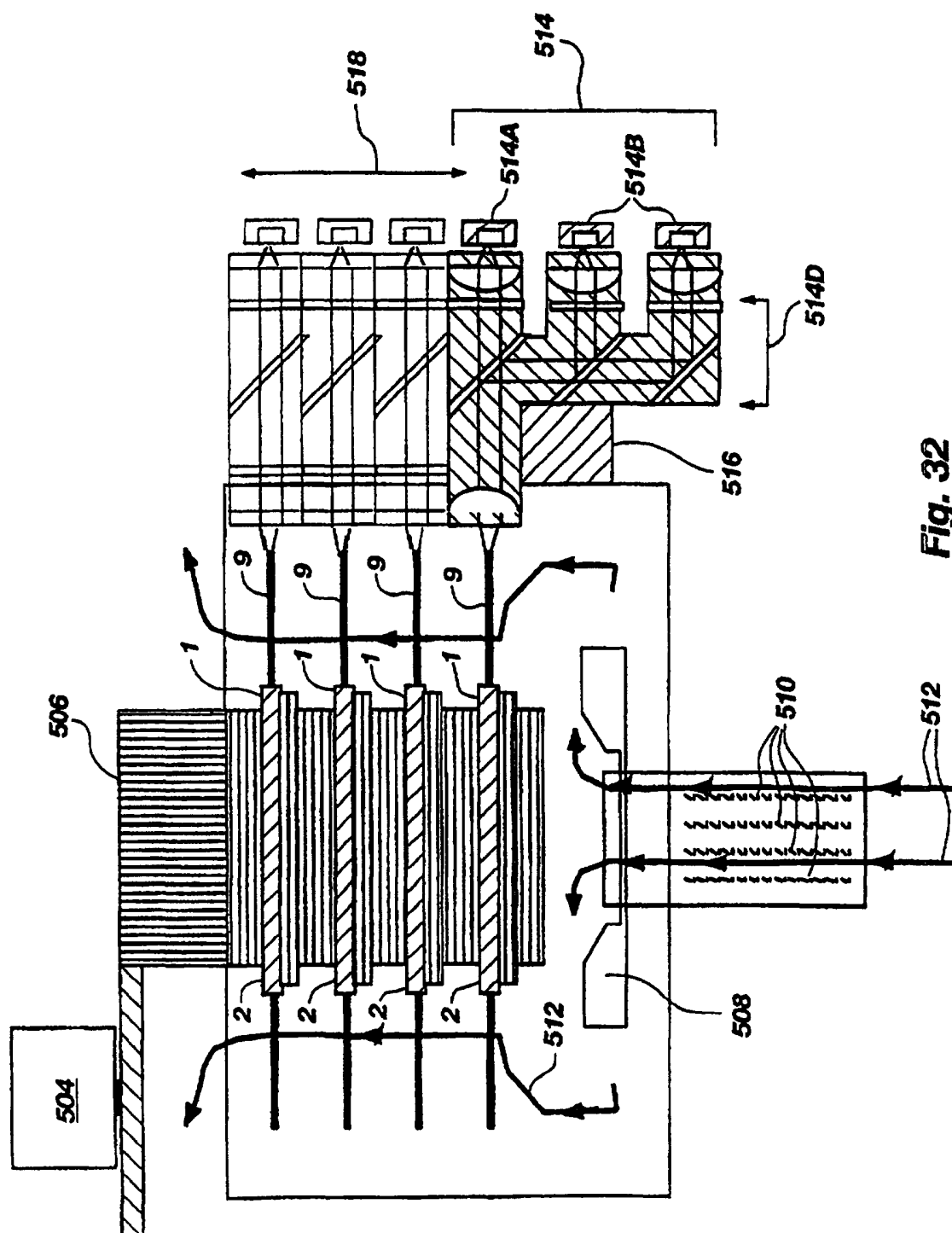


Fig. 32

ES 2 304 573 T3

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> university of Utah Research Foundation	
5	<120> <i>Sistema y método para llevar a cabo y supervisar procesos biológicos</i>	
	<130> 7475-73545	
10	<150> EP 03025810.7	
	<151> 2003-11 10	
	<150> EP 97929833.8	
15	<151> 1997-06-04	
	<150> PCT/US97/09856	
	<151> 1997.06-04	
20	<150> 08/658,993	
	<151> 1996-06-04	
25	<160> 6	
	<170> PatentIn version 3.2	
30	<210> 1	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
35	<400> 1	
	cgtaggtggac ttctctcaat	20
40	<210> 2	
	<211> 20	
	<212> DNA	
45	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 2	
50	agaagatgag gcatagcagc	20
	<210> 3	
	<211> 35	
55	<212> DNA	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
60	<220>	
	<221> misc	
	<222> (34)..(34)	
	<223> 3'-fluorescein	
65	<220>	
	<221> misc	

ES 2 304 573 T3

<222> (34)..(34)

<223> 3'-fluorescein

5 <400> 3

caaacagaca ccatggtgca cctgactcct gagga

35

10 <210> 4

<211> 30

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

15

<220>

<221> misc

<222> (29)..(29)

20 <223> 3'-phosphate

<400> 4

25 aagtctgccg ttactgccct gtggggcaag

30

<210> 5

<211> 22

30 <212> DNA

<213> *Homo sapiens*

<400> 5

35

ggttgccaa ttactccca gg

22

<210> 6

40 <211> 20

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

45

<400> 6

gctcactcag tgtggcaaag

20

50

55

60

65