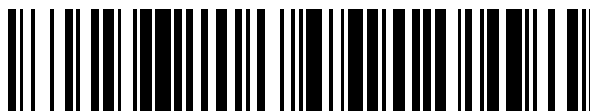


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 875 831**

51 Int. Cl.:

B01J 19/00 (2006.01)

G01N 21/25 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.01.2010** **PCT/GB2010/000028**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.07.2010** **WO10079338**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.01.2010** **E 10726151 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.05.2021** **EP 2376896**

54 Título: **Sistema óptico para reacciones químicas y/o bioquímicas**

30 Prioridad:

08.01.2009 US 143391 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.11.2021

73 Titular/es:

IT-IS INTERNATIONAL LTD (100.0%)
1 Wainstones Court Stokesley Business Park
Stokesley, North Yorkshire TS9 5JY, GB

72 Inventor/es:

HOWELL, JAMES, RICHARD;
WEBSTER, BENJAMIN, MASTERMAN;
CLARK, MARK, QUENTIN y
HOWELL, RICHARD, ALFRED

74 Agente/Representante:

PONTI & PARTNERS, S.L.P.

ES 2 875 831 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Sistema óptico para reacciones químicas y/o bioquímicas

- 5 **[0001]** La presente invención se refiere a un sistema óptico para monitorear reacciones, en particular, aunque no exclusivamente, para monitorear la luz que emana de los recipientes de reacción en los que se llevan a cabo reacciones químicas o bioquímicas.
- 10 **[0002]** Se llevan a cabo muchas reacciones químicas y bioquímicas que producen una señal de luz detectable, tal como una señal fluorescente, quimioluminiscente o bioluminiscente, que ocurre o se modifica en determinadas condiciones de reacción. Dichas señales pueden emanar debido a los reactivos o resultados de la reacción o reacciones que emiten luz en determinadas condiciones, por ejemplo, debido a la energía de excitación que se aplica, o pueden emanar al ser generadas por la propia reacción.
- 15 **[0003]** La detección de estas señales de luz se puede usar de varias maneras. En particular, pueden permitir la detección de la aparición de una reacción, que puede ser indicativa de la presencia o ausencia de un reactivo particular en una muestra de prueba, o para proporcionar información sobre el progreso o cinética de una reacción particular. Aunque el término «luz» se usa generalmente para incluir luz visible, se apreciará que las señales ópticas que pueden emanar de reacciones y ser detectadas también pueden ocurrir en las porciones infrarrojas y/o
- 20 ultravioletas del espectro y se pretende que el término «luz» abarque todas las señales ópticas que pueden emanar de reacciones de cualquier longitud de onda que se pueda detectar.
- [0004]** En muchos casos, una mezcla de reacción puede contener más de un reactivo de «señalización», y las señales de luz pueden necesitar ser detectadas o monitoreadas a lo largo del tiempo, para proporcionar un conjunto
- 25 completo de información sobre la ocurrencia, naturaleza o progreso de una reacción particular.
- [0005]** Un ejemplo particular de una reacción donde se monitorean señales detectables y en particular señales fluorescentes se encuentra en técnicas de amplificación de ácido nucleico y en particular la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La amplificación del ADN por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica
- 30 fundamental para la biología molecular. La PCR es una técnica ampliamente utilizada y eficaz para detectar la presencia de ácidos nucleicos específicos dentro de una muestra, incluso cuando las cantidades relativas del ácido nucleico diana son bajas. Por lo tanto, es útil en una amplia variedad de campos, incluidos el diagnóstico y la detección, así como en la investigación.
- 35 **[0006]** El análisis de ácido nucleico por PCR requiere preparación de muestras, amplificación y análisis del producto. Aunque estas etapas generalmente se realizan secuencialmente, la amplificación y el análisis pueden ocurrir simultáneamente.
- [0007]** En el transcurso de la PCR, un ácido nucleico diana específico se amplifica mediante una serie de
- 40 reiteraciones de un ciclo de etapas en las que los ácidos nucleicos presentes en la mezcla de reacción se desnaturalizan a temperaturas relativamente altas, por ejemplo, a 95 °C (desnaturalización), a continuación, la mezcla de reacción se enfría a una temperatura a la que los cebadores de oligonucleótidos cortos se unen al ácido nucleico diana monocaténario, por ejemplo, a 55 °C (recocido). Posteriormente, los cebadores se extienden usando una enzima de polimerasa, por ejemplo, a 72 °C (extensión), de modo que la secuencia de ácido nucleico original se ha replicado.
- 45 Los ciclos repetidos de desnaturalización, recocido y extensión dan como resultado el aumento exponencial en la cantidad de ácido nucleico diana presente en la muestra.
- [0008]** Se pueden agregar colorantes de ADN o sondas fluorescentes a la mezcla de PCR antes de la amplificación y se pueden usar para analizar el progreso de la PCR durante la amplificación. Estas mediciones
- 50 cinéticas permiten la posibilidad de que la cantidad de ácido nucleico presente en la muestra original pueda cuantificarse.
- [0009]** En algunos sistemas, el análisis de muestras ocurre simultáneamente con la amplificación en el mismo tubo dentro del mismo instrumento. Esta estrategia combinada disminuye el manejo de muestras, ahorra tiempo y
- 55 reduce en gran medida el riesgo de contaminación del producto para reacciones posteriores, ya que no hay necesidad de retirar las muestras de sus recipientes cerrados para un análisis adicional. El concepto de combinar la amplificación con el análisis del producto se conoce como PCR «en tiempo real».
- [0010]** Sin embargo, el hecho de que estos sistemas produzcan señales complejas y a menudo superpuestas,
- 60 a partir de múltiples fluoróforos diferentes dentro del sistema significa que se requiere una resolución de señal compleja para determinar la intensidad de la señal de los fluoróforos individuales.
- [0011]** La complejidad se agrava aún más porque las PCR generalmente se llevan a cabo en ciclos térmicos
- 65 contruidos específicamente, tales como calentadores de bloques, que acomodan matrices de múltiples recipientes de reacción al mismo tiempo. Estos se ciclan a continuación juntos y se monitorean las señales producidas por cada

recipiente.

[0012] Los sistemas actuales de fluorimetría por PCR a menudo se basan en sistemas de detección tales como detectores monocromáticos (CCD, fotodiodos, PMT, detectores CMOS, etc.) que por sí solos solo detectan la presencia o ausencia de luz, pero no pueden distinguir entre la luz de diferentes bandas de onda o colores. Por lo tanto, no son capaces de diferenciar directamente entre las diversas señales de fluoróforos diferentes. Este problema a menudo se aborda teniendo un medio externo para separar o filtrar la luz en diferentes bandas de onda para su detección en diferentes puntos del detector o en diferentes momentos.

10 **[0013]** Estos medios externos aumentan el coste, el tamaño y la complejidad del instrumento. Dichos medios externos a menudo necesitan montarse con precisión para la alineación óptica, y esto tiende a reducir la robustez del instrumento o conduce a un mayor tamaño, peso y costo asociado con el montaje.

[0014] Muchas aplicaciones útiles del análisis de PCR dependen de lecturas de múltiples bandas de onda, y todas requieren que cada recipiente utilizado sea medido, por lo que si el aparato óptico de un instrumento requiere reconfiguración para leer diferentes bandas de onda o recipientes, el tiempo necesario para adquirir una secuencia de lecturas aumenta inevitablemente (por ejemplo, el movimiento de una rueda de filtro o el escaneo de un sistema óptico entre pocillos introducirá un retraso inevitable y, en cualquier caso, si las adquisiciones no son concurrentes, tomarán más tiempo). Esto tiene el efecto de reducir la tasa máxima de adquisiciones y, por lo tanto, reducir la resolución temporal de las mediciones, lo que puede ser crítico cuando las adquisiciones se toman durante un procedimiento tal como una rampa de temperatura a los efectos del análisis de fusión.

[0015] El documento US 6.015.674 describe un aparato que incluye un soporte de muestra para retener una cámara de reacción que incluye una interfaz óptica, un cable de fibra óptica para suministrar un haz de excitación a una muestra alojada dentro de la cámara de reacción y para recibir luz emitida por la muestra, y una lente dispuesta coaxialmente con el cable de fibra óptica y posicionada fuera de la cámara de reacción para enfocar el haz de excitación a través de la interfaz óptica y dentro de un volumen de la muestra y para recolectar y transmitir al cable de fibra óptica la luz emitida dentro del volumen de la muestra. El documento EP 0 953 379 describe un aparato que comprende un soporte de recipiente metálico cuadrado con veinticuatro cámaras dispuestas para coger con facilidad en una posición vertical recipientes de reacción transparentes y cambiantes utilizados para transportar líquidos de reacción biológica. En las paredes laterales de las cámaras se disponen dos conectores con orificios de perforación asociados. Dentro de estos orificios se fijan de forma extraíble las primera y segunda fibras ópticas. Estas fibras están conectadas de tal manera que las extensiones axiales de las fibras se encuentran entre sí aproximadamente en un mismo punto del eje de la cámara, y de tal manera que la luz que escapa de las primeras fibras no puede alcanzar las segundas fibras directamente. Los extremos abiertos de las fibras están conectados a una fuente de luz común e individualmente a receptores de luz asociados, respectivamente. El documento EP 0 902 271 describe un aparato que emplea una pluralidad de dispositivos emisores de luz que cada uno puede obtener luz a través de una fibra óptica respectiva hacia una muestra de fluido respectiva de una pluralidad de muestras de fluido de una manera escalonada en el tiempo. Se genera luz en cada una de las muestras en diferentes momentos acordes con los momentos en los que se irradia luz sobre la muestra. Se utiliza un solo detector para detectar las luces emitidas por la pluralidad de muestras en estos diferentes momentos. El documento US 6.144.448 describe un aparato de detección de fluorescencia que permite la medición altamente precisa de fluorescencia incluso con cantidades de muestra diminutas, que tiene una fuerte capacidad de respuesta a las variaciones de temperatura, que permite la medición simultánea de una pluralidad de muestras, y donde la fuente de luz y el soporte del recipiente, y el soporte del recipiente y el detector de fluorescencia, están cada uno conectados ópticamente por fibras ópticas; y las fibras ópticas están conectadas al soporte del recipiente de tal manera que la muestra en el recipiente se excita para la fluorescencia desde debajo del recipiente de muestra retenido por el soporte del recipiente, y que pueden recibir la luz fluorescente que es emitida por la muestra desde debajo del recipiente de muestra.

50 **[0016]** Por lo tanto, sería útil tener una manera de poder distinguir y detectar diferentes longitudes de onda de luz que emanan de una serie de recipientes de reacción diferentes al mismo tiempo.

[0017] Por consiguiente, en un primer aspecto de la presente invención se proporciona un aparato para detectar la luz que emana de al menos un recipiente de reacción en el que puede ocurrir una reacción química o bioquímica, comprendiendo el aparato:

una pluralidad de recipientes de reacción, comprendiendo cada recipiente de reacción una porción de receptáculo en la que puede producirse la reacción química o bioquímica y dentro de la cual puede producirse luz que tiene un espectro, teniendo la porción de receptáculo un área de emisión desde la cual puede emanar al menos parte de la luz producida; un elemento de enmascaramiento que tiene una matriz de aberturas dispuestas de modo que haya al menos dos aberturas adyacentes a cada recipiente de reacción a través de las cuales puede pasar al menos parte de la luz producida que emana a través del área de emisión respectiva, siendo cada abertura más pequeña que el área de emisión del recipiente de reacción respectivo;

60 una pluralidad de guías de ondas de luz que comprenden al menos dos guías de ondas de luz para cada recipiente de reacción, estando cada guía de ondas de luz dispuesta para guiar la luz desde una abertura respectiva de la

65

matriz de aberturas en el elemento de enmascaramiento; y

un dispositivo de detección de luz para recibir simultáneamente la luz guiada por la pluralidad de guías de ondas de luz para todos los recipientes de reacción en los que se produce luz y para detectar simultáneamente espectros de la luz recibida de las guías de ondas de luz,

- 5 donde una guía de ondas por recipiente de reacción está dispuesta para guiar la luz a una porción del dispositivo de detección de luz para detectar un espectro específico de la luz y otra guía de ondas por recipiente de reacción está dispuesta para guiar la luz a otra porción del dispositivo de detección de luz para detectar un espectro específico de la luz.

- 10 **[0018]** Tal como se usa en esta invención, la expresión "recipiente de reacción" se refiere a cualquier forma de soporte o recipiente en el que se puede llevar a cabo la reacción. Por lo tanto, incluye tubos de reacción, pocillos en placas de reacción, así como portaobjetos o chips.

- [0019]** Generalmente, el espectro será característico de un reactivo particular tal como un colorante que está
15 presente en la reacción química o bioquímica, y por lo tanto la presencia o ausencia, o intensidad de la señal que tiene ese espectro característico puede ser indicativa de una propiedad o estado de la mezcla de reacción.

- [0020]** Tal como se usa en esta invención, la expresión «reacción química o bioquímica» incluye diversas operaciones en las que los reactivos pueden reaccionar juntos para producir reactivos o productos nuevos o diferentes,
20 y también el tratamiento de muestras para determinar los cambios que tienen lugar en los reactivos en condiciones cambiantes, tales como temperatura, potencial electroquímico o tiempo. Por lo tanto, la expresión incluye operaciones tales como el análisis del punto de fusión de reactivos, así como reacciones tales como la PCR.

- [0021]** En una realización, las diferentes porciones del dispositivo de detección de luz comprenden sensores
25 de luz sensibles a diferentes espectros de luz.

- [0022]** Los filtros pueden disponerse entre las guías de ondas de luz y las diferentes porciones del dispositivo de detección de luz, cada filtro respectivo pasando un espectro diferente de la luz a la porción respectiva del dispositivo de detección de luz.

- 30 **[0023]** Dependiendo de los otros elementos del aparato, puede haber otros beneficios, por ejemplo, la adquisición simultánea de cada banda de ondas de la o cada recipiente significa que en sistemas donde puede haber fluctuaciones en la fuente de excitación, cada banda de ondas y recipiente se adquirirán al mismo nivel de excitación. Cualquier cambio físico en el recipiente, como el movimiento del recipiente o la formación de burbujas, la condensación
35 o el movimiento del contenido afectará por igual a la adquisición de cada banda de ondas. Este es un beneficio considerable en los casos en que los niveles de un colorante (a menudo pasivo) se utilizan para normalizar los niveles de otro colorante (a menudo activo).

- [0024]** Dado que no hay necesidad de alterar las bandas de ondas de adquisición o la alineación del
40 recipiente/detector, por ejemplo, por movimiento físico, el detector puede adquirir datos con interrupción mínima. Dado que el detector puede adquirir todas las bandas de ondas disponibles tan fácilmente como cualquier subconjunto de bandas de ondas, no hay necesidad de trabajar con un conjunto de bandas de ondas reducido, y esto aumenta las oportunidades para un análisis posterior. La alineación física dentro de la máquina también se vuelve menos crítica, ya que el detector solo necesita estar alineado con los recipientes, en lugar de con filtros externos, etc., y cualquier
45 desalineación menor puede corregirse mediante el procesamiento de la imagen del detector, por ejemplo, reconocimiento de patrones y/o marcas de registro.

- [0025]** Para generar una señal detectable a partir de una reacción química o bioquímica, por ejemplo, utilizando reactivos de señalización fluorescentes, con frecuencia es necesario iluminar la mezcla de reacción para proporcionar
50 energía lumínica, por ejemplo, para que el fluoróforo se absorba, de modo que pueda emitir luz en su espectro característico.

- [0026]** Las señales pueden monitorearse continuamente o tomarse como ciertos puntos de tiempo particulares durante cada ciclo térmico solamente, de modo que se puedan ver los cambios en el número de ciclo.

- 55 **[0027]** Puede haber una pluralidad de fuentes de luz de excitación, que pueden proporcionar luz de excitación del mismo espectro o diferentes, la luz de excitación de cada fuente de luz de excitación se guía a cada uno de los recipientes de reacción a través de una o más guías de ondas de luz adicionales.

- 60 **[0028]** Por lo tanto, se pueden proporcionar múltiples fuentes de luz de excitación, dispuestas de modo que cada fuente dirija la luz hacia las guías de ondas de luz adicionales. De manera alternativa, se pueden proporcionar múltiples guías de ondas de luz adicionales a cada recipiente de reacción, guiando cada luz de excitación guía una o más fuentes de luz de excitación.

- 65 **[0029]** Las fuentes de luz de excitación adecuadas incluyen lámparas UV, halógenas, xenógenas o

fluorescentes, diodos emisores de luz, láseres o alguna combinación de estas fuentes. Esta excitación hace que los colorantes fluorescentes o marcadores que están contenidos con el recipiente de reacción emitan luz con un espectro característico en el intervalo del espectro adecuado para el tipo de detector, y esto a continuación puede ser captado por los detectores.

5

[0030] Las fuentes de luz de excitación se limitan preferentemente a regiones del espectro que son distintas de las longitudes de onda emitidas más informativas, por ejemplo, las longitudes de onda de emisión pico de cualquier fluoróforo, lo que reduce la necesidad de filtrado y permite el uso de una mayor porción del espectro sin interferencia de la excitación reflejada. Por ejemplo, las fuentes de luz de excitación ultravioleta y azul son útiles ya que los

10 fluoróforos más comúnmente utilizados emiten a longitudes de onda más largas.

[0031] La canalización de múltiples fuentes de luz de excitación en la misma guía de ondas se puede lograr, por ejemplo, mediante el uso de un espejo dicróico dispuesto para transmitir luz desde una fuente de luz posicionada para emitir luz directamente en la guía de ondas, y reflejar luz en la guía de ondas desde otra fuente dispuesta para

15 emitir luz perpendicular a la guía de ondas.

[0032] Se pueden usar múltiples fuentes del mismo espectro para aumentar la potencia de la luz de excitación, o se pueden usar fuentes de diferentes espectros, por ejemplo, donde cada fuente está diseñada para proporcionar excitación aceptable para un conjunto específico de fluoróforos. Cuando se proporcionan múltiples fuentes, se pueden

20 controlar individualmente (en términos de intensidad y espectro) para que las adquisiciones se puedan realizar en presencia de un espectro de excitación controlado. Por ejemplo, una aplicación común sería la adquisición de fluorescencia emitida de colorantes FAM y VIC, donde un LED azul con filtro apropiado proporciona excitación compatible con el colorante FAM, y un LED verde con filtro apropiado proporciona excitación compatible con el colorante VIC. Al iluminar solo el LED azul al adquirir espectros del colorante FAM, se puede hacer una mejor lectura

25 ya que la luz de excitación del LED verde no estará presente para interferir con la emisión de FAM en longitudes de ondas similares. El LED verde solo se puede iluminar a continuación para adquirir un espectro del colorante VIC.

[0033] El aparato también puede comprender una o más guías de ondas de luz adicionales dispuestas para guiar la luz desde una o más fuentes de luz de excitación hacia el elemento de matriz de salida, sin iluminar ningún

30 recipiente de reacción. Dicha guía de ondas de luz también puede incluir un filtro, por ejemplo, un filtro de densidad neutra para reducir la intensidad de luz dirigida desde las fuentes de luz de excitación al elemento de matriz de salida. Estas guías de luz adicionales proporcionan que las fuentes de excitación tengan su intensidad y espectros medidos de la misma manera y al mismo tiempo que la luz emitida y reflejada desde los recipientes de reacción. Esto proporciona, por ejemplo, una medición ratiométrica, donde la luz emitida desde los recipientes de reacción se

35 compara con el espectro y la intensidad de la fuente de excitación para proporcionar una medición más precisa que tiene una influencia reducida de cualquier variación en la intensidad y el espectro de la fuente de excitación.

[0034] El al menos un recipiente de reacción se forma preferentemente en una configuración generalmente

40 ahusada y puede estar formado por un capilar.

[0035] Preferentemente, el área de emisión está en una parte superior de la porción de receptáculo, aunque puede estar en un lado de la porción de receptáculo y o en una parte inferior de la porción de receptáculo.

[0036] El elemento de enmascaramiento puede proporcionarse mediante un montaje térmico en el que se

45 monta la matriz de recipientes de reacción.

[0037] Preferentemente, el área de emisión se encuentra en una parte superior de la porción del receptáculo y/o en un lado de la porción del receptáculo y/o en una parte inferior de la porción del receptáculo.

50 **[0038]** El dispositivo de detección de luz puede comprender un detector CCD o CMOS.

[0039] La pluralidad de recipientes de reacción puede estar contenida dentro de una placa de múltiples pocillos, tal como una placa de 48, 96 o 384 pocillos.

55 **[0040]** El aparato puede comprender además un ciclador térmico que tiene un calentador de bloques para retener la placa de múltiples pocillos.

[0041] El espectro específico puede ser característico de un reactivo o estado particular de un reactivo particular dentro de un recipiente de reacción y/o puede derivar de una sola especie de fluoróforo, presente en la

60 reacción.

[0042] En una realización preferida, la reacción química o bioquímica es una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) realizada en presencia de al menos un fluoróforo, que puede ser uno o más fluoróforos tomados del grupo que incluyen: fluoróforos que se intercalan con ácido nucleico, tales como colorantes intercaladores; fluoróforos

65 que se hibridan con ácido nucleico, tales como sondas de hibridación marcadas; fluoróforos que son modificados por

el procedimiento de PCR, tales como sondas de digestión marcadas; fluoróforos que proporcionan una transferencia de energía fluorescente entre ellos, tales como sondas marcadas fluorescentes; y otras sondas fluorescentes.

[0043] El fluoróforo es preferentemente un marcador fluorescente unido a una primera sonda de oligonucleótido que se hibrida específicamente con una secuencia de ácido nucleico diana de la PCR y donde la primera sonda de oligonucleótido contiene un segundo fluoróforo, que es capaz de intercambiar energía fluorescente con dicho marcador fluorescente cuando está presente juntos en la sonda, donde una polimerasa que tiene actividad de exonucleasa 5'-3' se utiliza en la PCR para digerir cualquier primera sonda unida al ácido nucleico diana durante una fase de extensión de la reacción.

[0044] Si es necesario, se puede proporcionar un dispositivo de enfriamiento o refrigeración para enfriar el dispositivo de detección de luz, particularmente cuando se trata de un CCD, para aumentar la relación señal/ruido y lograr lecturas más precisas.

[0045] Por lo tanto, la invención proporciona un aparato y un procedimiento según lo definido por las reivindicaciones adjuntas.

[0046] A continuación, se hace referencia a los dibujos diagramáticos adjuntos, de los cuales:

La FIG. 1 muestra un diagrama esquemático de un sistema óptico para detectar luz en un sistema de PCR;

La FIG. 2 muestra un diagrama esquemático de otro sistema óptico para detectar luz en un sistema de PCR;

La FIG. 3 muestra un diagrama esquemático de una realización de un sistema óptico para detectar luz en un sistema de PCR;

La FIG. 4 muestra un diagrama esquemático de otra realización de un sistema óptico para detectar luz en un sistema de PCR;

La FIG. 5 muestra una vista en planta de una placa de matriz utilizada en el sistema de la Fig. 1;

La FIG. 6 muestra una vista en planta de un área de imagen en el sistema de la Fig. 1;

La FIG. 7 muestra un diagrama esquemático, similar a la FIG. 1, pero que incluye excitación en el sistema óptico;

La FIG. 8 muestra un diagrama esquemático, similar a la FIG. 1, pero en una configuración alternativa;

La FIG. 9 muestra un diagrama esquemático, similar a la FIG. 8, pero que incluye excitación en el sistema óptico, de manera similar al sistema de la FIG. 7;

La FIG. 10 muestra un diagrama esquemático de otro sistema óptico para detectar luz en un sistema de PCR;

La FIG. 11 muestra un diagrama esquemático, similar a la FIG. 10, pero que incluye excitación en el sistema óptico;

La FIG. 12 muestra un diagrama esquemático de un sistema óptico adicional para detectar luz en un sistema de PCR;

La FIG. 13 muestra un diagrama esquemático, similar a la FIG. 12, pero que incluye excitación en el sistema óptico;

La FIG. 14 muestra un diagrama esquemático de todavía otro sistema óptico para detectar luz en un sistema de PCR;

La FIG. 15 muestra un diagrama esquemático, similar a la FIG. 14, pero sin LEDs de excitación separados;

La FIG. 16 muestra una vista ampliada del sistema de la FIG. 13;

La FIG. 17 muestra una vista ampliada similar a la de la FIG. 16, pero para parte del sistema de la FIG. 15;

La FIG. 18 muestra una vista en planta correspondiente a la FIG. 17;

La FIG. 19 muestra una vista similar a la de la FIG. 17, pero en una configuración alternativa; y

La FIG. 20 muestra una vista en planta correspondiente a la FIG. 19.

[0047] Por lo tanto, volviendo primero a la Fig. 1, se muestra una matriz de múltiples pocillos 1 que tiene una

cantidad de pocillos 2 en los cuales se proporcionan recipientes de reacción 3. La matriz 1 bien puede tener cualquier cantidad de pozos, por ejemplo, 48, 96 o 384 como en dichas matrices convencionales. La matriz 1 se puede alojar en un bloque calentador 4 de un ciclador térmico, como es bien conocido en el campo.

- 5 **[0048]** Como será evidente para un experto en la materia en este campo, los recipientes de reacción 3, después de tener los reactivos deseados insertados en ellos, pueden sellarse y pueden tener una tapa calentada colocada sobre ellos. El sello es generalmente de material plástico transparente que se adhiere al borde del recipiente de reacción y la tapa calentada, que generalmente está dispuesta para proporcionar presión sobre el sello en el borde del recipiente de reacción, y calentada para reducir la condensación en el interior del sello también es generalmente
10 transparente o provista de aberturas apropiadas para permitir que la luz del recipiente de reacción escape. Estos elementos no se muestran ya que no son parte de la invención y son bien conocidos.

- [0049]** Como se muestra en la Fig. 1, se proporciona una placa de enmascaramiento 5, que se colocaría sobre la tapa y/o sello calentado, si está presente. La placa de enmascaramiento evita que la luz escape de los recipientes de reacción 3, excepto a través de pequeñas aberturas 6 colocadas en la placa de enmascaramiento 5 para
15 corresponder al centro aproximado de cada recipiente de reacción 3, asegurando así que la cantidad máxima de luz incidirá en la pequeña abertura 6. En cada una de las aberturas pequeñas 6 se inserta una fibra óptica 7, que guía la luz que emana de los recipientes de reacción hacia un elemento de dispersión de luz, tal como un prisma 8. Un extremo de cada una de las fibras ópticas 7 está montado dentro de o en la abertura pequeña 6 y el otro extremo está montado
20 dentro de o en una abertura 30 proporcionada en una placa de matriz 9, como se muestra en la Fig. 5. Será evidente que las fibras ópticas 7 guían la luz desde cada uno de los recipientes de reacción y la dirigen en una matriz predeterminada hacia el prisma 8. La disposición de la matriz predeterminada de aberturas 30, como se muestra mejor en la Fig. 5, reorganiza eficazmente la matriz de luz de una matriz grande, que puede tener forma aproximadamente cuadrada si los recipientes de reacción 3 tienen aproximadamente el mismo ancho que longitud, en una matriz donde
25 el extremo de las fibras se empaqueta más estrechamente en una dimensión (verticalmente en la Fig. 5) que en la otra dirección (horizontalmente en la Fig. 5). También es posible proporcionar que la placa de enmascaramiento 5 se caliente, por ejemplo, haciendo pasar una corriente a través de elementos resistivos, y por lo tanto también funciona como una tapa calentada, si se desea. En este caso, las fibras se eligen preferentemente para ser resistentes a las temperaturas requeridas de la tapa calentada. La luz de los extremos de las fibras ópticas 7 en la placa de matriz 9 se dirige a lo largo de la trayectoria de luz 11 al prisma 8 (u otro elemento de dispersión de luz, tal como una rejilla de difracción), que dispersa la luz de cada fibra 7 (y, por lo tanto, de cada recipiente de reacción 3) en un espectro completo 12, como se muestra esquemáticamente en la Fig. 1, en un detector 10. Los espectros completos son captados en imágenes en un plano de imagen 13, como se muestra en la Fig. 6 en el detector 10. De esta manera, se proporcionan simultáneamente espectros completos de la luz que emana de los recipientes de reacción en el detector
30 10. Por lo tanto, se verá que la separación de la matriz en la placa de matriz 9 se elige de modo que los espectros 12, cuando se dispersan por el prisma 8 en el plano de imagen 13 en el detector 10, se empaquetan relativamente de forma hermética en una dirección, de modo que la altura de los espectros está espaciada razonablemente, y están espaciados lo suficiente en la otra dirección para que los espectros dispersos no se superpongan. Dado que las aberturas pequeñas tienen un diámetro sustancialmente menor que el tamaño del área superior de los recipientes de reacción, la matriz de aberturas en la placa de matriz 9 (y la matriz de espectros completos 12 en el plano de imagen
40 13) puede ser menor que el tamaño de la matriz 1 de recipientes de reacción 3.

- [0050]** El detector 10 puede, en una realización, consistir en un sensor CMOS monocromo de 1/2" (12 mm), junto con la electrónica y el software adecuados que permiten capturar una trama «bruta» que proporciona los niveles
45 de luz medidos reales para cada píxel. Esto se utiliza con un ensamblaje de lentes fotográficas de megapíxeles para formar una cámara que puede enfocar la luz de un plano en el espacio en el chip del sensor. Cabe señalar que «lente» se usa en esta invención indistintamente para significar ya sea una «lente óptica», una sola pieza de vidrio o un «ensamblaje de lente fotográfica» que significa una o más lentes utilizadas como un conjunto para generar imágenes en un plano de sensor tal como el sensor CMOS. A continuación, la cámara se utiliza para obtener imágenes a través
50 de una simple lente de vidrio única y un prisma de vidrio sin recubrimiento de 30° en la matriz de fibra.

- [0051]** Los sensores que proporcionan un control de obturación global que proporciona intervalos de exposición sustancialmente equivalentes para cada píxel son adecuados para su uso con el sistema, ya que la exposición de toda la imagen durante el mismo período de tiempo significa que cada canal de cada espectro en esa imagen se ve afectado
55 de la misma manera por cualquier condición que varíe en el tiempo, como la intensidad de excitación variable, etc. Para cada recipiente de reacción, cada canal también se ve afectado igualmente por cualquier condición que varíe en el tiempo en el recipiente de reacción, tal como condensación, temperatura, movimiento físico tal como formación y movimiento de burbujas, etc.

- [0052]** Los sensores que son adecuados para su uso con el sistema incluyen aquellos que proporcionan diferentes subconjuntos de píxeles a través de la matriz de sensores para ser capturados con diferentes parámetros, por ejemplo, parámetros electrónicos tales como ganancia y desplazamiento analógicos, voltaje de referencia ADC, barrera de potencial de píxeles y otros ajustes de captura comúnmente controlados. Los ejemplos incluyen sensores tales como el Micron MT9T001 TM, donde los píxeles se agrupan en bloques 2x2, donde los píxeles superiores
60 izquierdos de cada bloque pertenecen a un subconjunto, los píxeles superiores derecho pertenecen a otro subconjunto

y de manera similar para los píxeles inferior izquierdo e inferior derecho. Cada uno de estos subconjuntos de píxeles puede tener un parámetro de ganancia ADC diferente. Esto se puede utilizar para ampliar eficazmente el intervalo dinámico del sensor; por ejemplo, si se utiliza una ganancia de 4x en filas pares de la imagen, y se utiliza una configuración de ganancia de 8x en filas impares, la imagen espectral se adquirirá efectivamente como dos imágenes de resolución media con diferentes niveles de ganancia, donde la imagen de ganancia inferior tiene un nivel máximo de luz más alto en saturación, y la imagen de ganancia más alta proporciona una mayor precisión a niveles de luz bajos. Otro ejemplo es el sensor de imagen Aptina/Micron MT9V024 TM donde la imagen se puede dividir en una matriz de regiones rectangulares, y cada región rectangular puede tener ajustes de control de ganancia y ganancia digital individuales. La imagen espectral es particularmente adecuada para un sensor que tiene ganancia diferente en diferentes regiones, ya que las regiones pueden disponerse para que coincidan con las imágenes espectrales, dando diferentes ajustes de ganancia para diferentes áreas de los espectros y, por lo tanto, para diferentes regiones de longitud de onda. Esto se puede utilizar para adquirir regiones de los espectros que tienen diferentes niveles de intensidad para dar la mejor SNR y menos ruido de cuantificación para cada región.

- 15 **[0053]** Los sensores que proporcionan una respuesta no lineal en términos de códigos de salida al nivel de luz son adecuados para su uso con el sistema, particularmente cuando la respuesta del sensor puede programarse, por ejemplo, mediante múltiples regiones de respuesta lineal y/o compensación. Un ejemplo de dicho sensor es el Aptina/Micron MT9V024 TM, que puede utilizar una compensación de 12 bits a 10 bits, y también se puede dar hasta 3 regiones si hay una respuesta lineal diferente, lo que resulta en un mayor intervalo dinámico. Por ejemplo, dichos sensores pueden configurarse de modo que produzcan una mayor luz para la ganancia de salida a niveles de luz bajos, proporcionando una buena SNR y sensibilidad a los niveles de luz asociados con la amplificación de PCR de ciclo temprano donde la precisión de medición es crítica, pero a continuación producen una ganancia menor a los niveles de luz más altos asociados con la PCR de ciclo medio y tardío en la fase de meseta, donde la precisión de medición es menos crítica. Una región final de ganancia aún menor a niveles de luz muy altos asociados con el reflejo de la luz de excitación puede usarse para permitir la medición de la luz reflejada sin la saturación que resultaría de un nivel de ganancia superior uniforme.

- 30 **[0054]** Tal como se muestra en la Fig. 6, al proporcionar un espectro completo 12 de luz dispersada de cada recipiente de reacción al mismo tiempo, el detector 10 puede detectar cualquier espectro específico deseado dentro del espectro completo. Por lo tanto, la Fig. 6 muestra tres bandas de ondas (correspondientes a los colores rojo 14, verde 15 y azul 16) dentro de un espectro completo 12, que se puede detectar, según se desee. Por supuesto, también se pueden detectar longitudes de onda particulares, si se desea, al igual que otras bandas de ondas. Cada espectro completo 12 en el plano de imagen 13 puede ser escaneado por el detector y monitoreado y analizado, según lo requieran el tiempo y la longitud de onda de acuerdo con los requisitos del análisis particular que se lleva a cabo, como será evidente para un experto en el campo.

- 40 **[0055]** En una alternativa a la descrita anteriormente, las aberturas 6 no necesitan ser pequeñas con respecto al área de la parte superior del recipiente de reacción, pero pueden estar hechas de un tamaño sustancialmente similar al mismo. En este caso, el extremo de cada una de las fibras ópticas 7 que se monta dentro o en la abertura sería de tamaño sustancialmente similar y el diámetro de la fibra se reduciría a un diámetro más pequeño, que sería el del otro extremo montado dentro o en la abertura 30 proporcionada en la placa de matriz 9. Será evidente que esto tiene la ventaja de que sustancialmente toda la luz que emana de los recipientes de reacción sería capturada por el extremo de gran diámetro de las fibras ópticas y luego se «concentraría» a medida que pasa a través de la porción ahusada de la fibra. Entre la placa de matriz 9 y el detector 10, el sistema sería el mismo que se describió anteriormente, de modo que ambos tienen la ventaja de que las señales de la matriz de recipientes de reacción se reorganizan en un formato más adecuado para pasar a través del prisma y al detector, es decir, que el tamaño total de la «imagen» que pasa desde la placa de matriz es menor en tamaño total que el de la propia placa de matriz.

- 50 **[0056]** Por ejemplo, en una imagen directa de la matriz de recipientes tomada desde arriba, solo alrededor de 1/4 (o más) del área de imagen de placa normalmente tendría una cantidad sustancial de luz emitida desde los recipientes - el 3/4 restante de la imagen es del área entre los recipientes. Cuando el elemento de enmascaramiento y las fibras se colocan entre la matriz de recipientes y el detector y la luz emitida se reorganiza como se explicó anteriormente, la imagen resultante es más pequeña de lo que sería una imagen directa, lo que permite que toda la imagen (es decir, la luz de todos los recipientes en la matriz) pase a través del prisma y hacia el detector, aunque menos de la imagen resultante muestre realmente luz emitida (por ejemplo, el sistema puede tener solo alrededor de 1/10 del área iluminada) para dejar el espacio necesario para que los espectros de pocillo se dispersen sin superposición.

- 60 **[0057]** A continuación, se describirán otros sistemas, con los mismos elementos o elementos similares como se describió anteriormente con respecto a las Figs. 1, 5 y 6 con los mismos números de referencia. Por lo tanto, como se muestra en la Fig. 2, un segundo sistema tiene los mismos elementos que el sistema de la Fig. 1, excepto que las fibras ópticas 7 no son necesarias. En este caso, si la matriz 1 de los recipientes de reacción 3 no es demasiado grande, puede no ser necesario comprimir la matriz de espectros completos representados por imágenes en el plano de imagen 13 del detector 10. En este caso, sin embargo, la placa de enmascaramiento 5 todavía se utiliza para bloquear la mayor parte de la luz que emana de las reacciones en los recipientes de reacción 3, y solo para permitir

que los haces 11 de luz de diámetro mucho menor pasen a través de las pequeñas aberturas 6 en la placa de enmascaramiento 5 hacia el prisma 8 y hacia la imagen 13. Esto es para evitar que los espectros completos 12 se superpongan en el plano de imagen 13, que de lo contrario sería el caso si el prisma dispersara la luz del área superior completa de cada recipiente de reacción 3.

5

[0058] Las realizaciones de las Figs. 3 y 4 enmascaran de manera similar los recipientes de reacción 3 usando una placa de enmascaramiento 5 y solo permiten que la luz escape de cada recipiente de reacción a través de una pequeña abertura 6 en la placa de enmascaramiento 5. Nuevamente, una fibra óptica 7 se monta dentro de o en la abertura pequeña 6, pero esta vez, hay varias (en este caso, tres) aberturas pequeñas 6 proporcionadas adyacentes a cada recipiente de reacción 3, de modo que hay varias fibras ópticas 7 por recipiente de reacción 3 que guían la luz desde cada recipiente de reacción 3 a varias porciones separadas del detector 10. Aquí, hay tres de dichas fibras ópticas 7 que guían la luz desde cada recipiente de reacción 3 a tres porciones separadas del detector 10. Por lo tanto, el detector 10 puede proporcionarse con porciones separadas para detectar diferentes espectros específicos, por ejemplo, para detectar colores rojo, azul y verde. Por lo tanto, no se necesita ningún elemento de dispersión de luz separado.

[0059] Como se muestra en la Fig. 3, hay tres conjuntos 17, 18 y 19 de fibras ópticas 7, las fibras dentro de cada conjunto guían la luz desde cada recipiente de reacción 3 a diferentes porciones 20, 21 y 22 del detector 10 para detectar espectros específicos rojos, verdes y azules, respectivamente. Cada porción respectiva del detector 10 incluye un sensor 23 y un filtro 24, 25 y 26. Los segundos extremos de las fibras ópticas de cada conjunto 17, 18 y 19 están dispuestos adyacentes al filtro respectivo 24, 25 y 26 para filtrar la luz desde los segundos extremos del conjunto respectivo de fibras para limitar la luz que llega al sensor respectivo a un espectro o banda de ondas específico. Por lo tanto, en este caso, el filtro 24 es un filtro rojo, el filtro 25 es un filtro verde y el filtro 26 es un filtro azul. Los sensores 23 pueden ser iguales o pueden ser específicos para el color de la luz que deben detectar. Por supuesto, si los sensores 23 son específicos del color, de modo que solo detectarán un espectro específico, entonces los filtros no son necesarios, como se muestra en la Fig. 4, y los segundos extremos de cada conjunto de fibras ópticas pueden colocarse directamente adyacentes al sensor apropiado, tal como el sensor rojo 27, el sensor verde 28 y el sensor azul 29.

[0060] Con la mayoría de los sistemas descritos anteriormente, se apreciará que otra abertura pequeña 37 puede colocarse en la placa de enmascaramiento 5 adyacente a cada recipiente de reacción 3 con un extremo de una fibra óptica 31 montado dentro de o en la abertura pequeña 37, como se muestra en la Fig. 7. Estas fibras ópticas 31 se pueden usar para llevar luz de excitación a los recipientes de reacción al tener sus otros extremos posicionados adyacentes a una o más fuentes de luz de excitación 32, 33. Las fibras de excitación 31 se pueden unir en el extremo de aceptación de excitación, para facilitar la dirección de luz hacia ellas. Esta puede ser una placa perforada 35, pero esto no es necesario, ya que a menudo es más fácil simplemente agrupar las fibras en un haz aproximadamente empaquetado hexagonalmente.

[0061] En este sistema (que se basa en el primer sistema descrito anteriormente), una fuente de luz de excitación puede ser un LED de alta intensidad azul 32, que tiene una lente esférica sobre este. La otra fuente de luz de excitación puede ser un LED verde 33. Los LED 32 y 33 están dispuestos a cada lado de un espejo dicróico 34 para combinar la luz de excitación de ambos LED 32 y 33 y dirigirla a un homogeneizador 36 (esencialmente un prisma hexagonal o cilindro de vidrio). El espejo dicróico 34 permite que la luz azul del LED azul 32 se transmita, y refleja la luz verde del LED verde 33 en el homogeneizador, que proporciona una iluminación más uniforme de cada guía de luz de excitación, al reflejar la luz de excitación múltiples veces dentro del homogeneizador. Esta combinación produce una iluminación espacialmente homogénea del extremo pulido del haz de fibras de excitación, de modo que cada recipiente de reacción 3 recibe una excitación bastante igual. Cabe señalar que el espejo dicróico 34 podría reemplazarse por algún otro medio para dirigir la luz de ambos LED hacia las fibras, por ejemplo, una guía de luz en forma de Y, o incluso simplemente al tener los LED en ángulo para que ambos brillen en un ángulo hacia las fibras.

50

[0062] Un ejemplo puede tener 16 pares de fibras de emisión/excitación, montadas en férulas metálicas cilíndricas con una excitación y una emisión por férula. Las férulas se pueden colocar a continuación en los orificios de una tapa calentada convencional para su uso. Las fibras están hechas de plásticos resistentes al calor para tolerar el contacto con la tapa calentada a ~110 °C.

55

[0063] Por supuesto, si se usan las fibras ahusadas, que cubren sustancialmente todas las áreas de la parte superior de los recipientes de reacción, entonces no habría espacio para una fibra de excitación adicional. En este caso, la luz de excitación puede ser guiada por la misma fibra que guía la luz emitida.

[0064] Con el fin, entonces, de detectar los espectros de los recipientes de reacción, la fuente de excitación (azul o verde) se enciende, se deja reposar durante un corto tiempo, y a continuación se realiza una adquisición de una imagen de los extremos de fibra. Se pueden aplicar varios procedimientos de corrección a esta imagen; por ejemplo, corregir cualquier desplazamiento en la lectura restando una imagen «oscura» de la imagen adquirida. Esta imagen oscura se toma con el sensor expuesto a la menor cantidad de luz posible, para medir el desplazamiento constante que cada píxel da incluso sin luz (esta es una técnica de corrección óptica estándar). Otra etapa de

65

procesamiento consiste en desechar los píxeles de la imagen que se considera que no proporcionan una medida fiable de la luz; por ejemplo, los llamados píxeles calientes que dan una lectura más alta debido a fugas de corriente u otros defectos de fabricación.

5 **[0065]** La imagen corregida final muestra a continuación los espectros tal como se representa en la Fig. 6. Para corregir las diferencias inevitables en el posicionamiento de la óptica y las fibras, se puede realizar una calibración. Esto debe ser necesario solo cuando el instrumento se haya fabricado por primera vez, o después de que haya sido alterado - debido a un choque físico, desmontaje, etc. La calibración puede simplemente utilizar una matriz de recipientes vacíos para reflejar la luz de excitación en cada fibra. La imagen relativamente bien definida de los extremos de fibra en la imagen se puede ver entonces, ya que la luz de excitación tiene una banda de ondas estrecha. La ubicación de cada punto brillante para los recipientes de reacción se puede encontrar manualmente o automáticamente, y esto se puede utilizar como punto de referencia fijo en el espectro para ese recipiente de reacción. A continuación, se define una región rectangular (u otra forma) para el espectro de cada recipiente y se almacena junto con la calibración.

15 **[0066]** Finalmente, para interpretar una imagen dada, se extrae un espectro para cada recipiente. La región espectral para ese recipiente se busca desde la calibración, y el área espectral se escanea simplemente de izquierda a derecha, promediando la intensidad de los píxeles en cada área para dar una intensidad para el espectro mismo en la banda de ondas correspondiente a esos píxeles. Hay varios medios de conversión, pero una manera sencilla y adecuada es promediar todos los píxeles en cada columna vertical de la región espectral, dando más peso a los píxeles más brillantes en el centro del espectro verticalmente. Cada media de columna se convierte entonces en la intensidad de esa columna o canal de la lectura. Una etapa final de corrección sería mapear los canales a la longitud de onda real dispersa a esa columna de la imagen - esto se puede hacer modelando el comportamiento de dispersión del prisma o midiendo espectros conocidos, pero puede no ser siempre necesario, ya que es posible comparar espectros por canales en lugar de por longitud de onda.

[0067] Aunque en la descripción anterior, se ha demostrado que la luz que emana de los recipientes de reacción se emite desde un área en la parte superior del recipiente de reacción, por supuesto, será evidente que el área emisora puede estar en cualquier posición. La «parte superior» del recipiente de reacción pretende cubrir cualquier posición del área emisora en el recipiente de reacción del que emana la luz. Por lo tanto, por ejemplo, la FIG. 8 muestra el mismo sistema que la FIG. 1, con los mismos elementos que tienen los mismos números de referencia que en la FIG. 1, pero en una configuración inversa, donde la placa de enmascaramiento 5 se coloca adyacente al bloque calentador 4, que, en este caso, tiene orificios 38 en los pocillos 2 entre los elementos principales 39 del bloque calentador 4 que exponen los recipientes de reacción 3. Los recipientes de reacción 3 se forman en una configuración generalmente ahusada de modo que las áreas emisoras de los recipientes de reacción 3 se encuentren en un punto más bajo del recipiente de reacción ahusado. Por supuesto, cuando los recipientes de reacción están sellados, la matriz de recipientes de reacción en el bloque calentador 4 puede disponerse en cualquier configuración deseada, de modo que el punto más bajo del recipiente de reacción 3 ahusado, como se muestra en la FIG 8, bien puede ser la «parte superior» en el sentido físico.

40 **[0068]** La FIG. 9 muestra la misma configuración del sistema que la FIG. 8, pero con las fibras de excitación 31 como en el sistema descrito anteriormente con respecto a la FIG. 7. En este caso, como en la FIG. 7, la placa de enmascaramiento 5 está provista de una segunda abertura 37 adyacente al orificio 38 en la parte inferior de cada pocillo 2. Tal como se describió anteriormente, las fibras de excitación 31 guían la luz de excitación desde las fuentes de luz de excitación 32, 33 a los recipientes de reacción 2 para excitar cualquier fluoróforo en estos.

[0069] Las FIGs. 10 y 11 ilustran sistemas similares a los de las FIGs. 8 y 9, pero donde la placa de enmascaramiento 5 está formada por el propio bloque calentador 4. Como se puede ver, en este caso, los elementos de bloque calentador 39 se extienden sustancialmente por debajo de los pocillos 2 y proporcionan las aberturas 38 en las que se insertan las fibras 7 (y 31 en el caso de la FIG. 11). En el sistema de la FIG. 11, se ilustra que las fibras 7 y 31 se combinan en una fibra antes de insertarse en las aberturas 38. Las fibras 7 y 31 se pueden combinar de cualquier manera conocida, por ejemplo, mediante una forma de combinación paralela, por ejemplo, con múltiples fibras contenidas en la misma cubierta externa.

55 **[0070]** Volviendo ahora a la FIG. 12, se muestra una disposición que usa una matriz de tubos capilares 40 montados en una placa de montaje 41 en lugar de los recipientes de reacción 2. Los tubos capilares 40 pueden calentarse, por ejemplo, soplando gas calentado alrededor de ellos. En este caso, las características restantes son similares a las de la FIG. 10 y tienen los mismos números de referencia, excepto que los extremos de las fibras 7 sobresalen a través de la placa de enmascaramiento 5 para permitir que se coloquen apropiadamente cerca del extremo del respectivo tubo capilar 40. Como se muestra mejor en la FIG. 16, debido a que una fibra 7 tiene un ángulo limitado de recepción 42 (o emisión), al tener el extremo de la fibra relativamente cerca del fluido de reacción 43 en el capilar significa que se permite cualquier tolerancia en la posición del capilar, que puede ser algo mayor en el caso de los tubos capilares colgantes 40 que en los pocillos en un bloque calentador. Por supuesto, si el extremo de la fibra está demasiado cerca, donde el extremo capilar solo encajará en la intersección de los «conos» de excitación y emisión, cualquier movimiento horizontal del capilar da como resultado que no se capture la luz. Por otro lado, si las

fibras están más alejadas, tal como en la placa de montaje 5, a continuación, las variaciones en la posición o el movimiento de los tubos capilares 40 cuando están en posición, por ejemplo, debido a la presión del gas de calentamiento, se permitirían debido al aumento en el cono de recepción 42, pero hay una reducción correspondiente en la eficiencia de la recolección de luz y en la excitación debido al aumento en el tamaño del cono de excitación.

5 Como se muestra en el sistema de la FIG. 12, se pueden proporcionar diodos emisores de luz (LED) 44 de luz de excitación adecuada adyacentes a cada tubo capilar 40. En el sistema alternativo que se muestra en la FIG. 13, la luz de excitación se proporciona de la misma manera que en sistemas anteriores con fibras de excitación 31 que se utilizan para llevar luz de excitación a los tubos capilares 40 desde una o más fuentes de luz de excitación 32, 33.

10 **[0071]** La FIG. 14 muestra todavía otro sistema similar al de la FIG. 10, donde los mismos elementos tienen los mismos números de referencia. En este caso, la luz de excitación es proporcionada por los LED 44, como en el sistema de la FIG. 12. Sin embargo, los orificios 38 en el bloque calentador 4 a través de los cuales se extienden los extremos de las fibras 7, se colocan aquí para extenderse hacia arriba desde la base del bloque calentador y a continuación para extenderse a los pocillos 2 en el bloque calentador desde un lado de este, de modo que los extremos
15 de las fibras 7 están adyacentes a los lados de los recipientes de reacción 3. Por supuesto, se apreciará que el dibujo no muestra la extensión completa de los orificios 38, sino que solo muestra las fibras 7 que se extienden hacia arriba a través del bloque calentador 4 de una manera esquemática, con el orificio 38 que se muestra adyacente al lado del pocillo 2. Las fibras 7 también se muestran con un ángulo recto agudo, aunque, en la práctica, no estarían tan inclinadas. Como se muestra mejor en las FIGs. 17 y 18, las fibras 7 deben colocarse con precisión adyacentes al lado
20 del recipiente de reacción 3 de modo que el ángulo de recepción 42 pueda capturar la mayor cantidad de luz posible que emane del fluido de reacción 43. Sin embargo, como se explicó anteriormente, una vez en posición, los recipientes de reacción 3 no se moverán indebidamente, por lo que los resultados no se verán afectados tanto como con los tubos capilares 40.

25 **[0072]** La FIG. 15 muestra un sistema adicional, similar al de la FIG. 14, en el que los mismos elementos tienen los mismos números de referencia. En este caso, los orificios 38 se hacen relativamente pequeños, con los extremos de las fibras montados dentro de los orificios para que el lado del pocillo 2 en el elemento de bloque de calentamiento 39 forme la placa de enmascaramiento para evitar que la luz distinta de la que pasa a través de la abertura 38 llegue a la fibra 7. Aunque no se muestra en la FIG. 15, se apreciará que la luz de excitación podría proporcionarse mediante
30 una fibra de excitación 31 que guía la luz de excitación de una o más fuentes de luz de excitación, como en sistemas anteriores. Aunque la fibra de excitación podría proporcionarse en el mismo orificio 38 que la fibra de emisión 7, como se muestra en la FIG. 17, esto significaría que ni la fibra de excitación 31 ni la fibra de emisión 7 estarían en la posición ideal para el recipiente de reacción, ya que tanto el ángulo de recepción 42 como el ángulo de emisión 45 estarían descentrados. Las FIGs. 19 y 20 muestran cómo las dos fibras podrían separarse dentro del bloque calentador de
35 modo que sus extremos estén adyacentes al recipiente de reacción separados en 90° para minimizar la cantidad de luz de excitación que podría entrar en la fibra de emisión 7. Como se puede observar en la FIG. 19, tanto el ángulo de recepción 42 como el ángulo de emisión 45 ahora están centrados en el recipiente de reacción 3, con el fluido de reacción 43 totalmente dentro de los ángulos de recepción y emisión de las respectivas fibras.

40 **[0073]** Se observará que, aunque solo se han descrito en detalle algunos sistemas particulares de la, un experto en la materia puede realizar diversas modificaciones y mejoras sin apartarse del alcance de la presente invención según se define en las reivindicaciones. Por ejemplo, probablemente a menudo será útil tener más componentes ópticos en la trayectoria de la placa 9 al plano 13 en la Fig. 1. Por ejemplo, podría ser útil «doblar» la trayectoria óptica 11 mediante la adición de uno o más espejos. Esto reduce el tamaño de todo el ensamblaje óptico, al tiempo que se
45 observan muy pocas diferencias en el funcionamiento real o el rendimiento del sistema. Otro ejemplo de un componente adicional es tener una o más lentes adicionales antes o después del prisma 8 para proporcionar una corrección adicional de la trayectoria de luz; de nuevo, esto puede no ser esencial, pero es una técnica óptica bien conocida para corregir diversas aberraciones, etc. Dichos elementos ópticos adicionales pueden formar parte del elemento de dispersión, pero pueden ser componentes separados.

50 **[0074]** También se apreciará que, aunque el plano de imagen 13 en la Fig. 1 se muestra en la parte frontal del detector 10, podría, alternativamente, estar en la parte posterior del detector, si el detector consiste en un sensor CMOS con un módulo de lente de cámara adecuado delante de él. En los sistemas mostrados en la Fig. 14 y 15, las fibras pasan verticalmente a través del bloque 4, sin embargo, se apreciará que, en algunas circunstancias, la porción
55 vertical de las fibras podría estar dispuesta para estar fuera del bloque, por ejemplo, en un bloque que tiene una fila de pocillos, las fibras simplemente podrían pasar horizontalmente desde la «cara lateral» del bloque a los pocillos, ya que no hay otros pocillos en el camino. Una montura con dos filas de pocillos obviamente podría estar dispuesta de la misma manera, con fibras que entran desde los dos lados verticales más largos de la montura.

REIVINDICACIONES

1. Aparato para detectar espectros de luz que emanan de una pluralidad de recipientes de reacción (3) en cada uno de los cuales puede ocurrir una reacción química o bioquímica, comprendiendo el aparato:
 - 5 una pluralidad de recipientes de reacción, comprendiendo cada recipiente de reacción (3) una porción de receptáculo en la que puede producirse la reacción química o bioquímica y dentro de la cual puede producirse luz que tiene un espectro, teniendo la porción de receptáculo un área de emisión desde la cual puede emanar al menos parte de la luz producida;
 - 10 un elemento de enmascaramiento (5) que tiene una matriz de aberturas (6) dispuestas de modo que haya al menos dos aberturas (6) adyacentes a cada recipiente de reacción (3) a través de las cuales puede pasar al menos parte de la luz producida que emana a través del área de emisión respectiva, siendo cada abertura (6) más pequeña que el área de emisión de la porción de receptáculo del recipiente de reacción (3) respectivo;
 - 15 una pluralidad de guías de ondas de luz que comprenden al menos dos guías de ondas de luz (7) para cada recipiente de reacción (3), estando cada guía de ondas de luz (7) dispuesta para guiar la luz desde una abertura (6) respectiva de la matriz de aberturas en el elemento de enmascaramiento (5); y
 - 20 un dispositivo de detección de luz (10) para recibir simultáneamente la luz guiada por la pluralidad de guías de ondas de luz (7) para todos los recipientes de reacción (3) en los que se produce luz y para detectar simultáneamente espectros de la luz recibida de las guías de ondas de luz, donde una guía de ondas por recipiente de reacción está dispuesta para guiar la luz a una porción del dispositivo de detección de luz para detectar un espectro específico de la luz y otra guía de ondas por recipiente de reacción está dispuesta para guiar la luz a otra porción del dispositivo de detección de luz para detectar un espectro específico de la luz.
2. Aparato según la reivindicación 1, donde las diferentes porciones del dispositivo de detección de luz
 - 25 comprenden sensores de luz sensibles a diferentes espectros de la luz.
3. Aparato según la reivindicación 1, que comprende además filtros dispuestos entre las guías de ondas de luz y las diferentes porciones del dispositivo de detección de luz, pasando cada filtro respectivo un espectro diferente de la luz a la porción respectiva del dispositivo de detección de luz.
- 30 4. Aparato según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además una pluralidad de guías de ondas de luz adicionales, estando cada guía de ondas de luz adicional para cada recipiente de reacción dispuesta entre una abertura adicional en el elemento de enmascaramiento adyacente a cada recipiente de reacción y una fuente de luz de excitación para guiar la luz de excitación desde la fuente de luz de excitación a cada uno de los
 - 35 recipientes de reacción.
5. Aparato según la reivindicación 4, que comprende una pluralidad de fuentes de luz de excitación, que puede proporcionar luz de excitación del mismo espectro o diferente, siendo la luz de excitación de cada fuente de luz de excitación guiada a cada uno de los recipientes de reacción a través de una o más guías de ondas de luz
 - 40 adicionales.
6. Aparato según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el dispositivo de detección de luz comprende un detector CCD o CMOS.
- 45 7. Aparato según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la pluralidad de recipientes de reacción está contenida dentro de una placa de múltiples pocillos.
8. Aparato según la reivindicación 7, que comprende además un ciclador térmico que tiene un calentador de bloques para retener la placa de múltiples pocillos.
- 50 9. Un procedimiento para detectar espectros de luz que emanan de una pluralidad de recipientes de reacción de un aparato según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, mediante el cual en cada uno de dichos recipientes puede ocurrir una reacción química o bioquímica, donde la reacción química o bioquímica es una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) llevada a cabo en presencia de al menos un fluoróforo, que puede ser uno o más
 - 55 fluoróforos tomados del grupo que incluye:
 - fluoróforos que se intercalan con ácido nucleico, tales como colorantes intercaladores;
 - fluoróforos que se hibridan con ácido nucleico, tales como sondas de hibridación marcadas;
 - fluoróforos que son modificados por el procedimiento de PCR, tales como sondas de digestión marcadas;
 - 60 fluoróforos que proporcionan una transferencia de energía fluorescente entre ellos, tales como sondas marcadas fluorescentes; y
 - otras sondas fluorescentes.

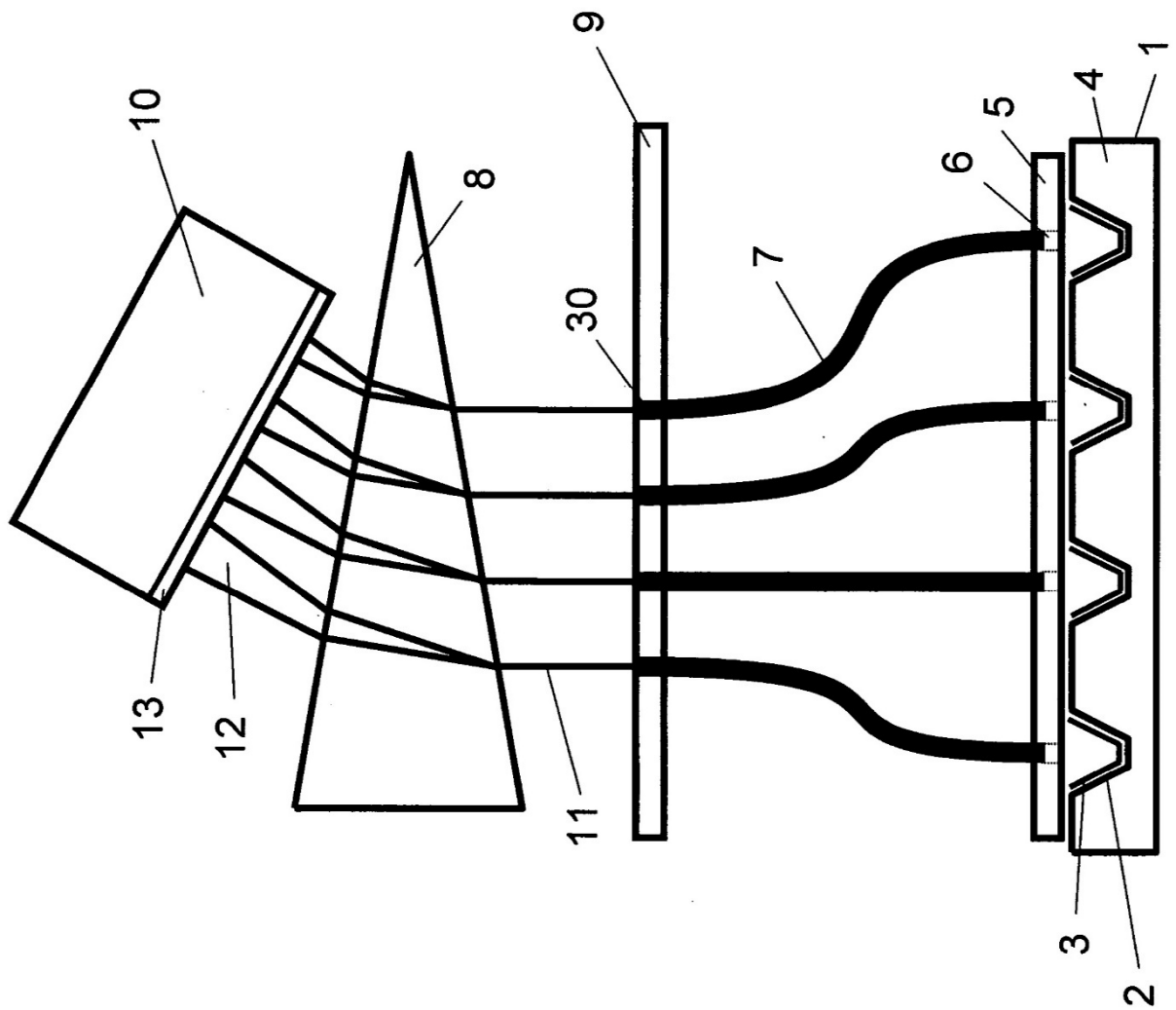


Fig. 1

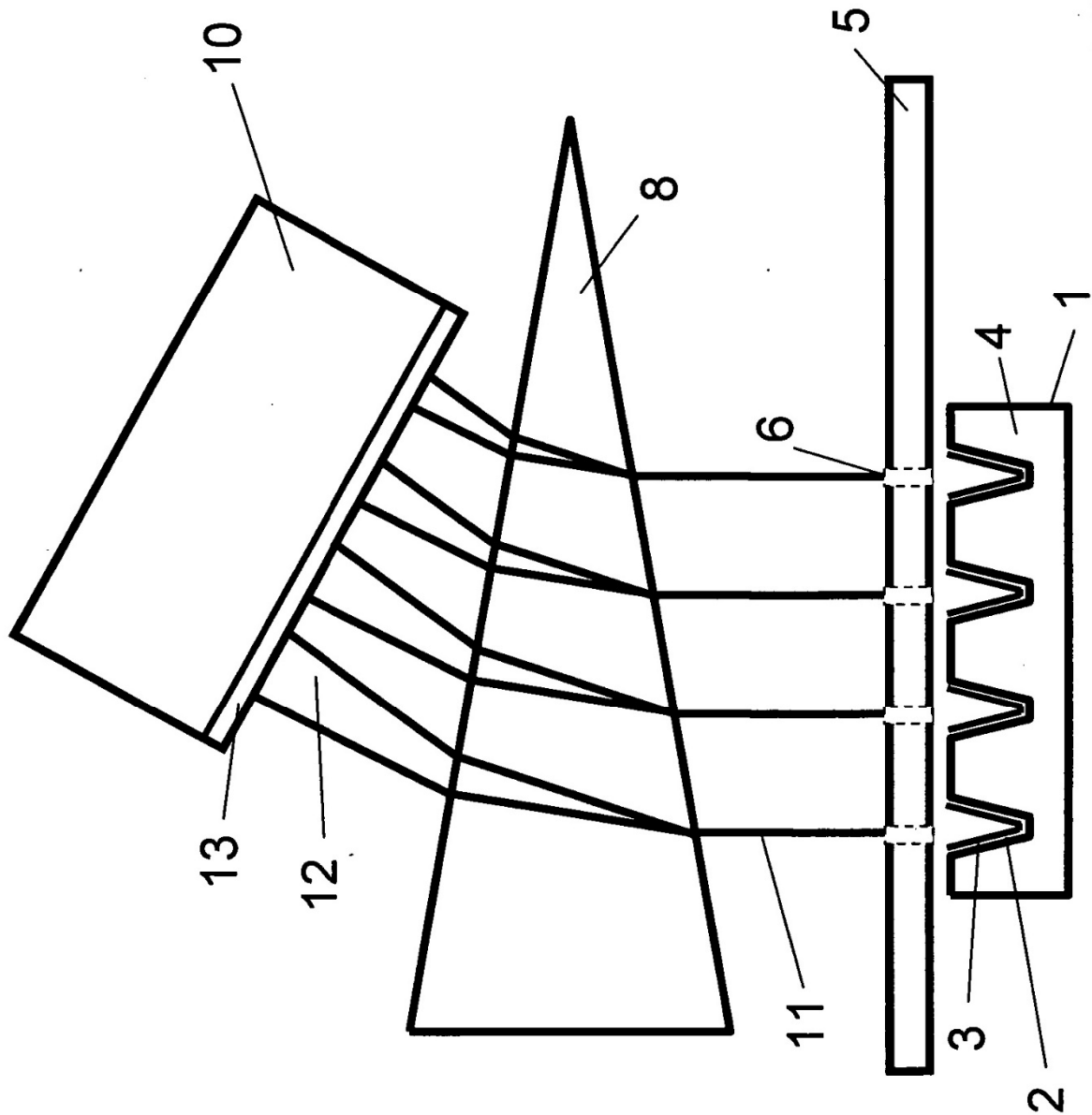


Fig. 2

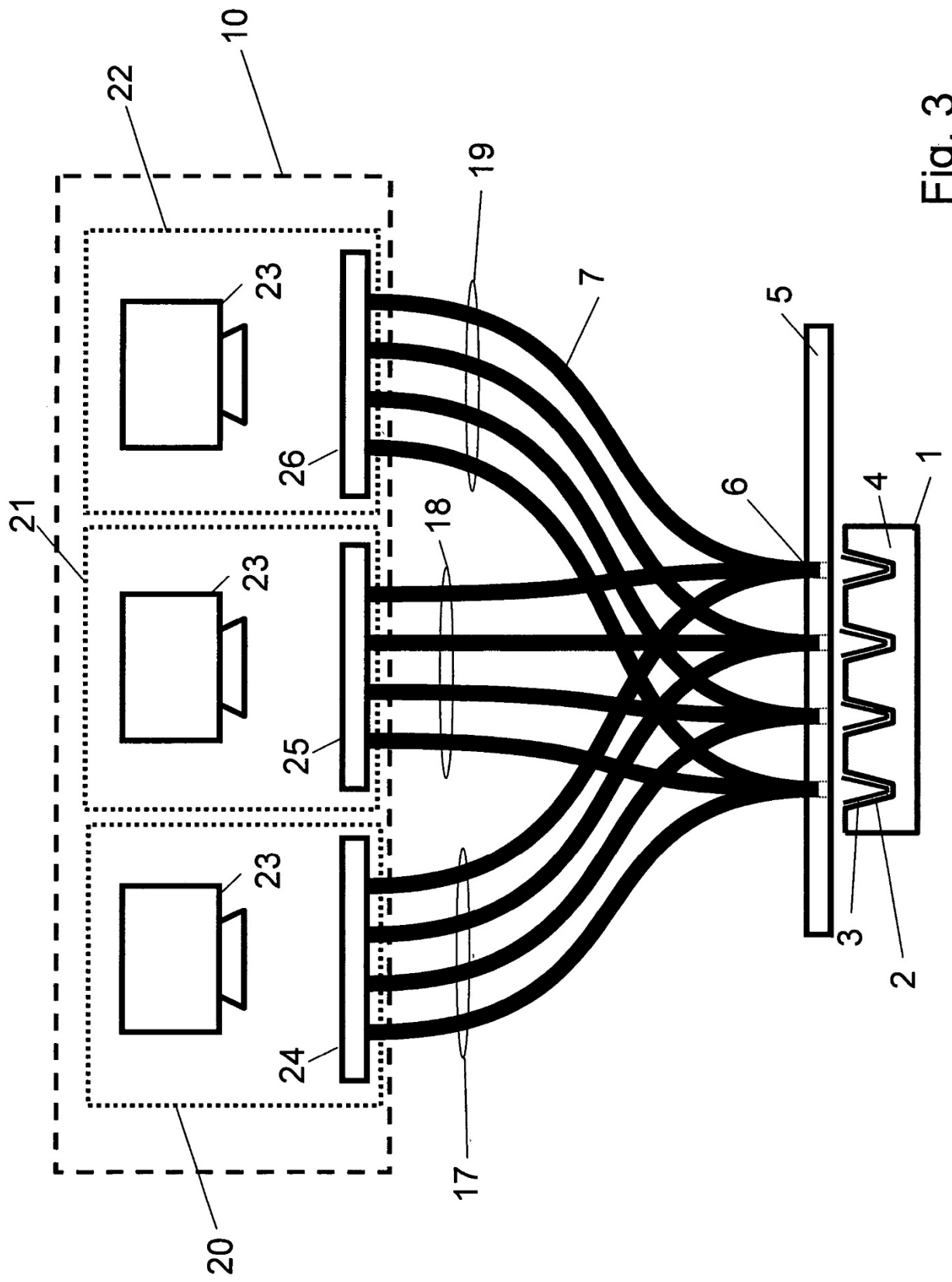


Fig. 3

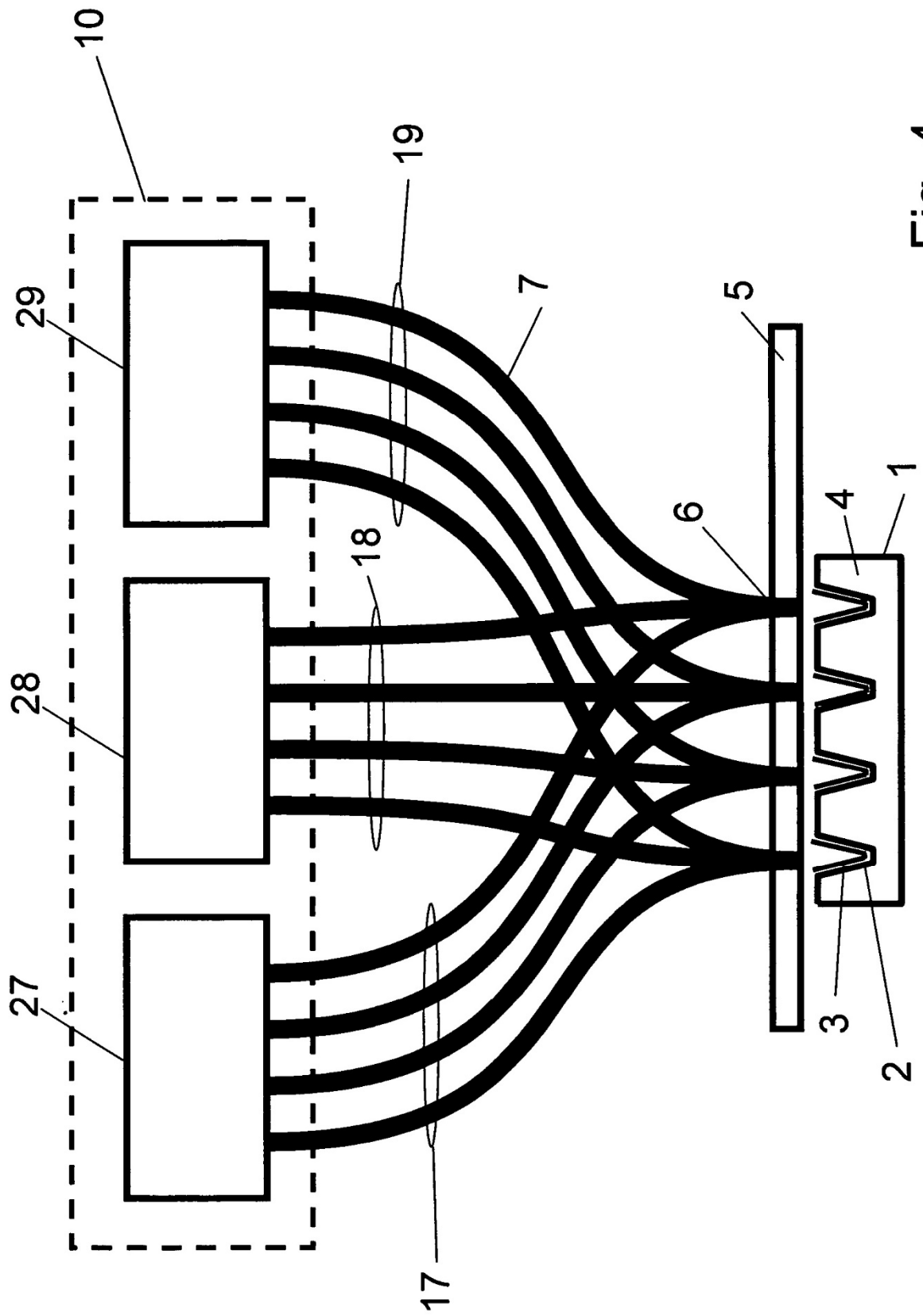


Fig. 4

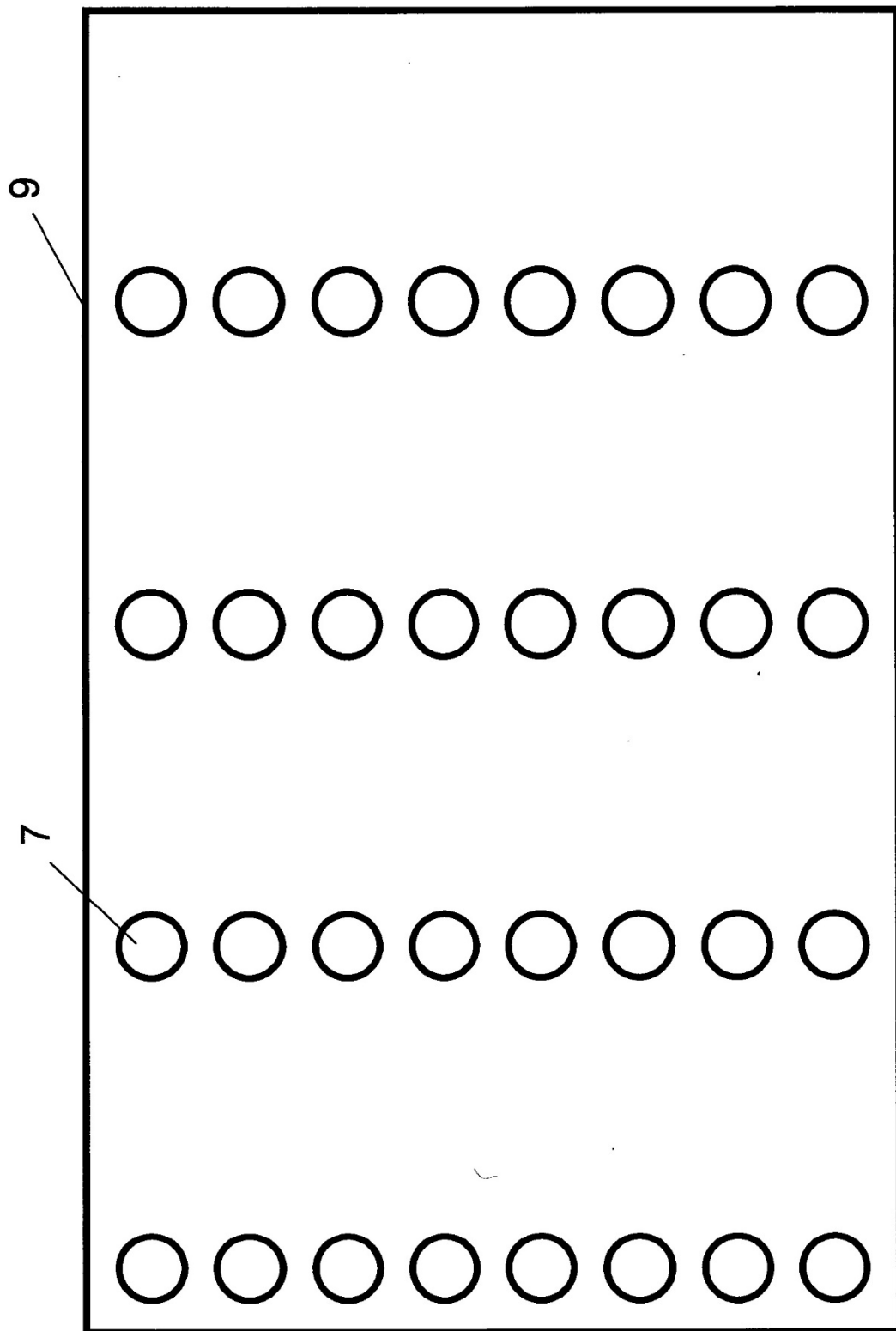


Fig. 5

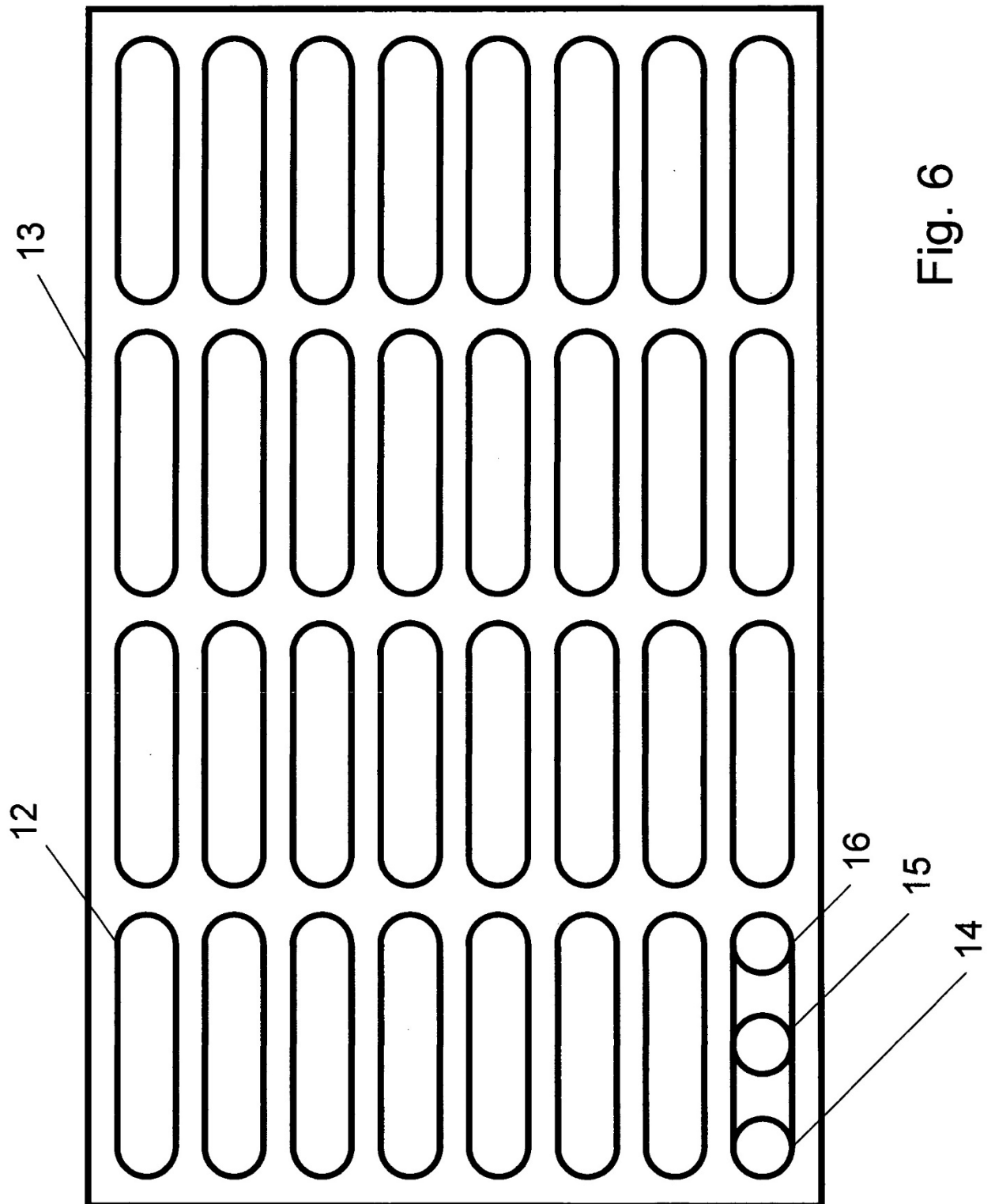
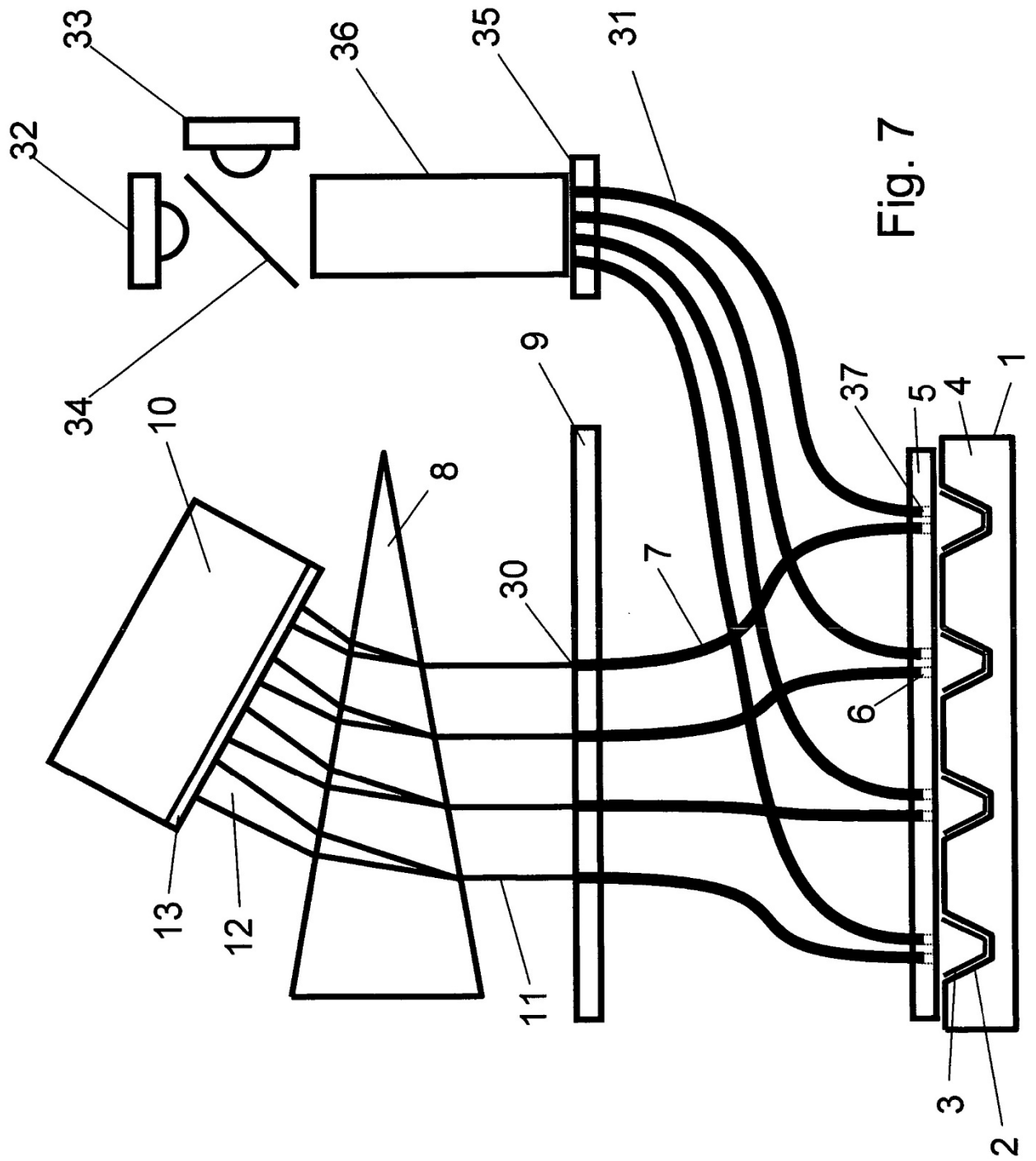


Fig. 6



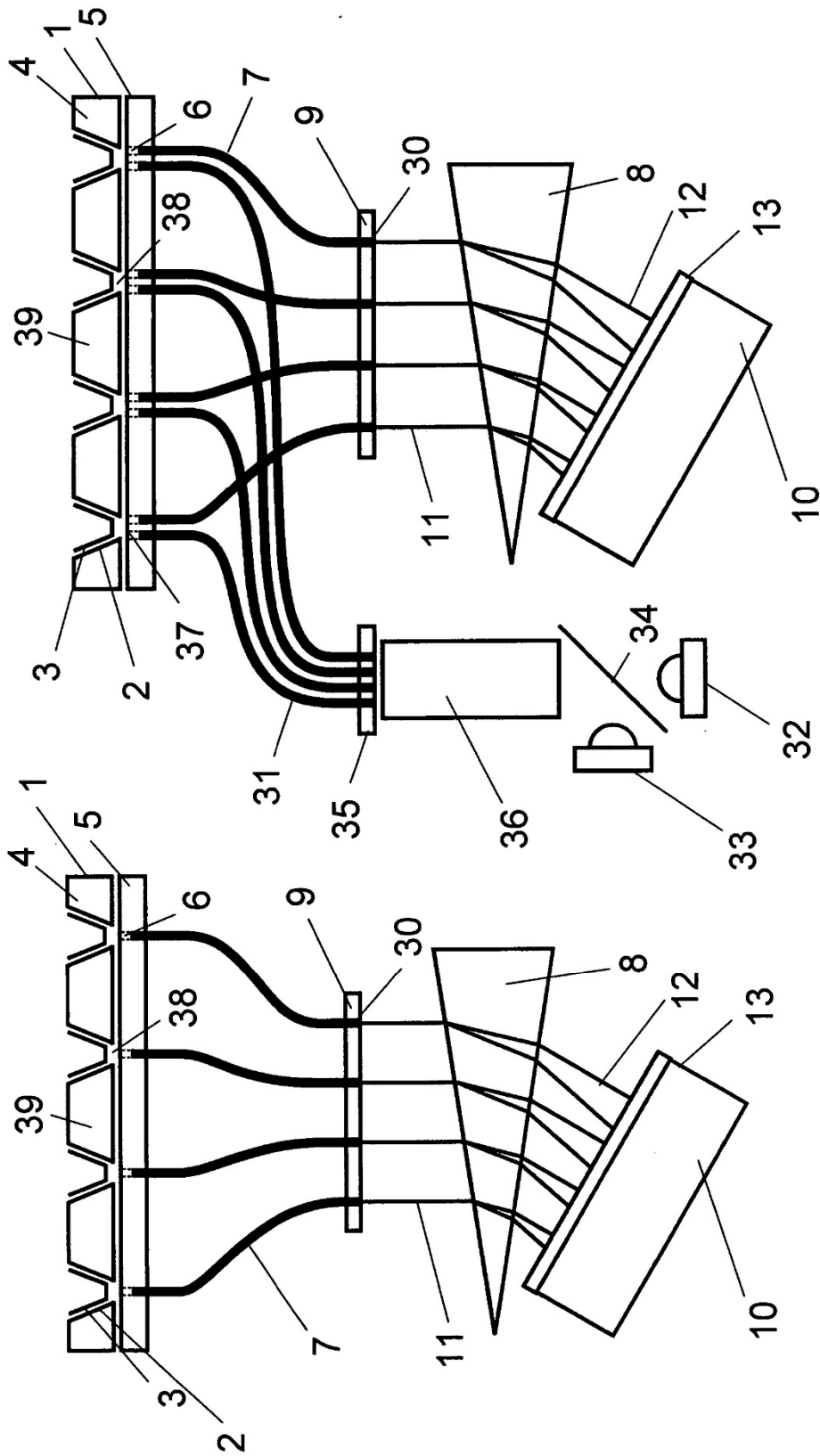


Fig. 9

Fig. 8

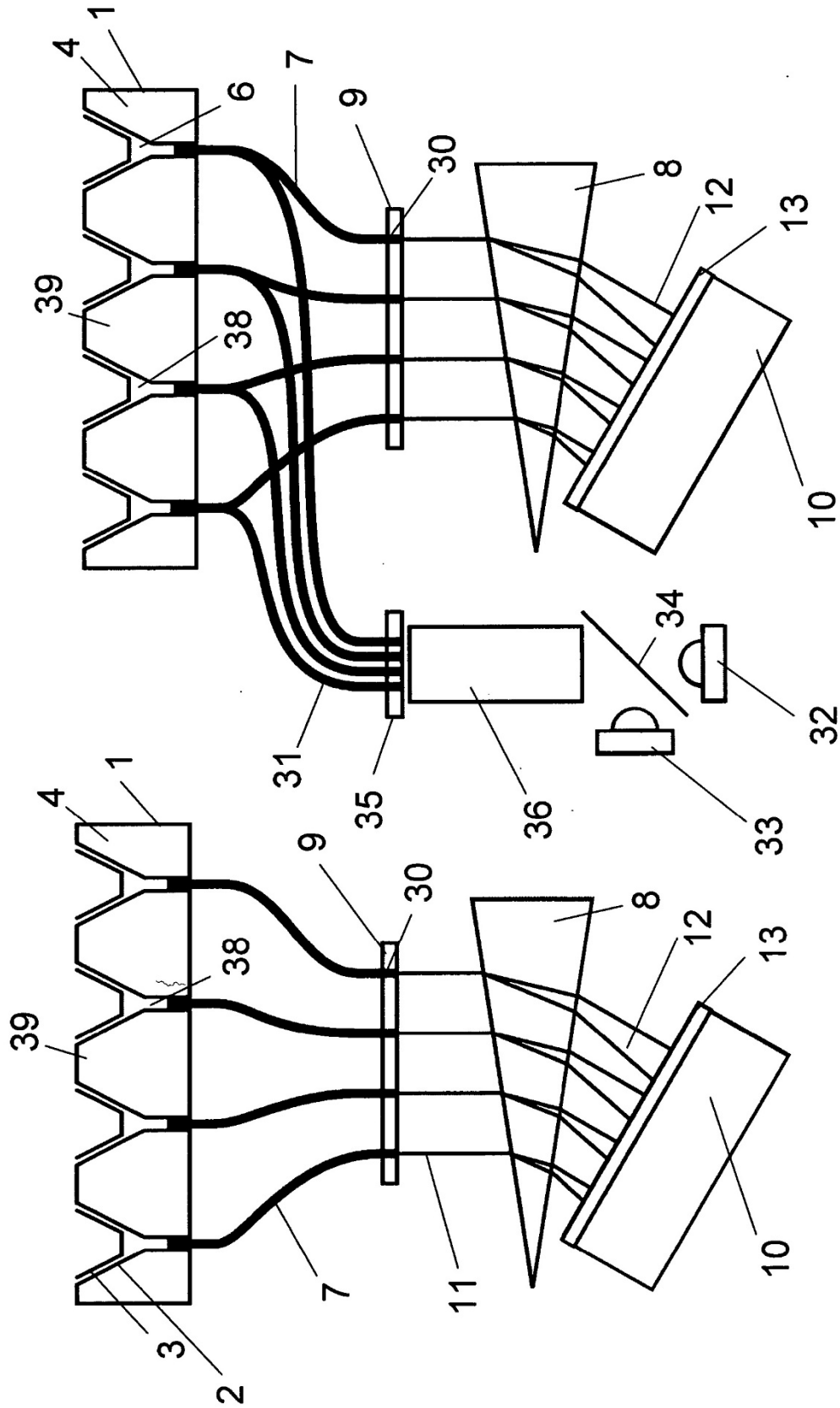


Fig. 11

Fig. 10

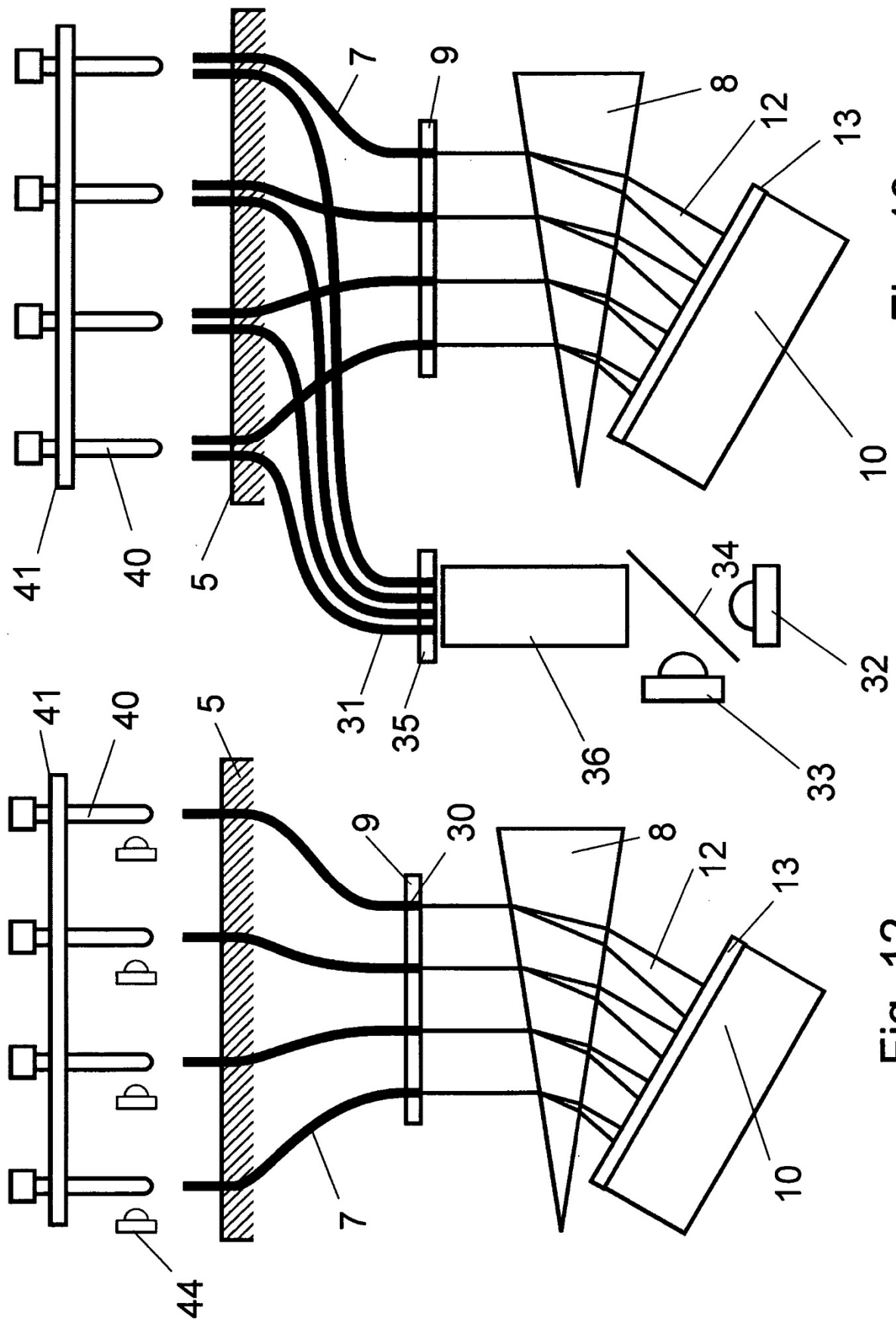


Fig. 13

Fig. 12

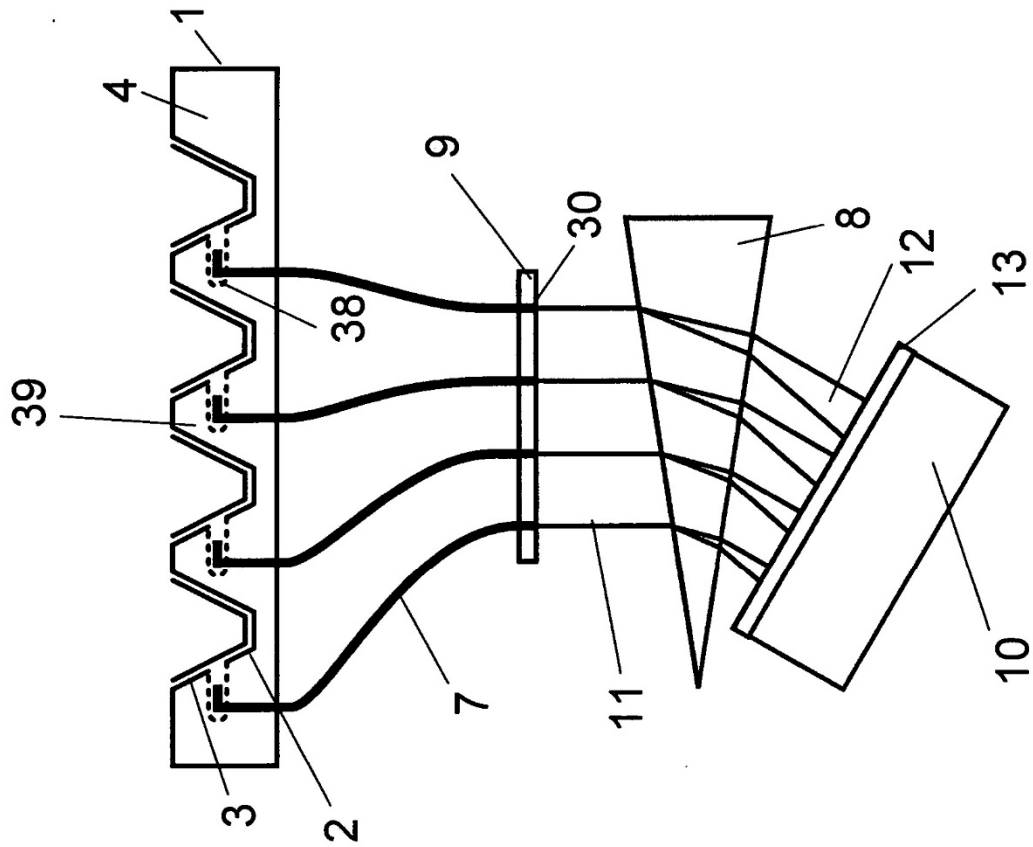


Fig. 14

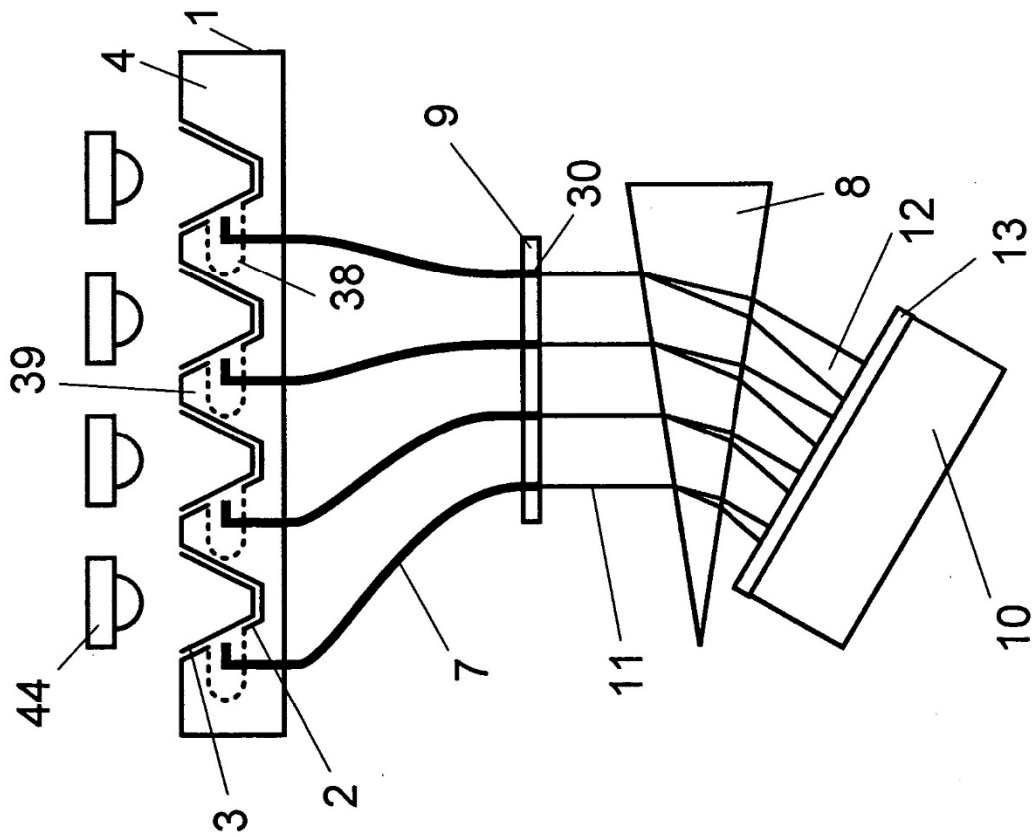


Fig. 15

Fig. 20

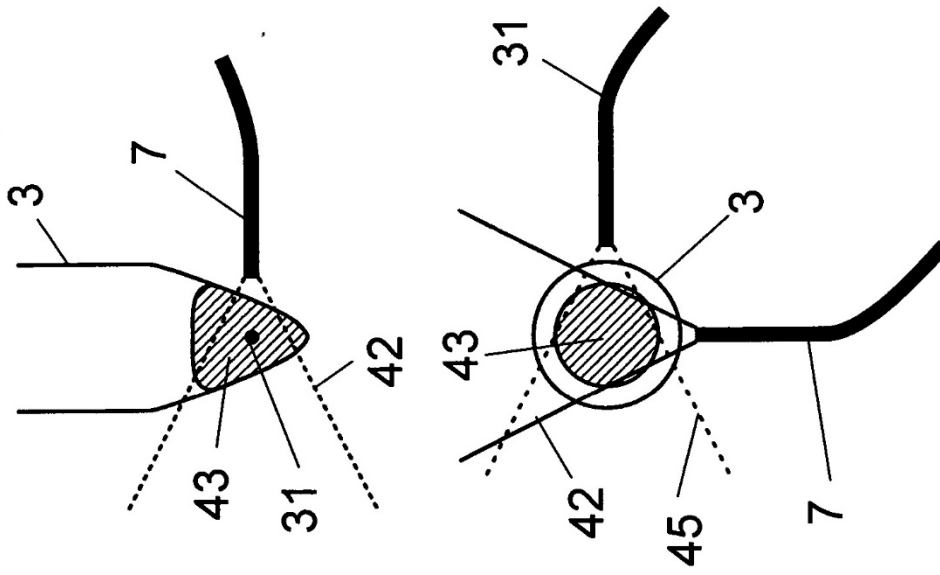


Fig. 19

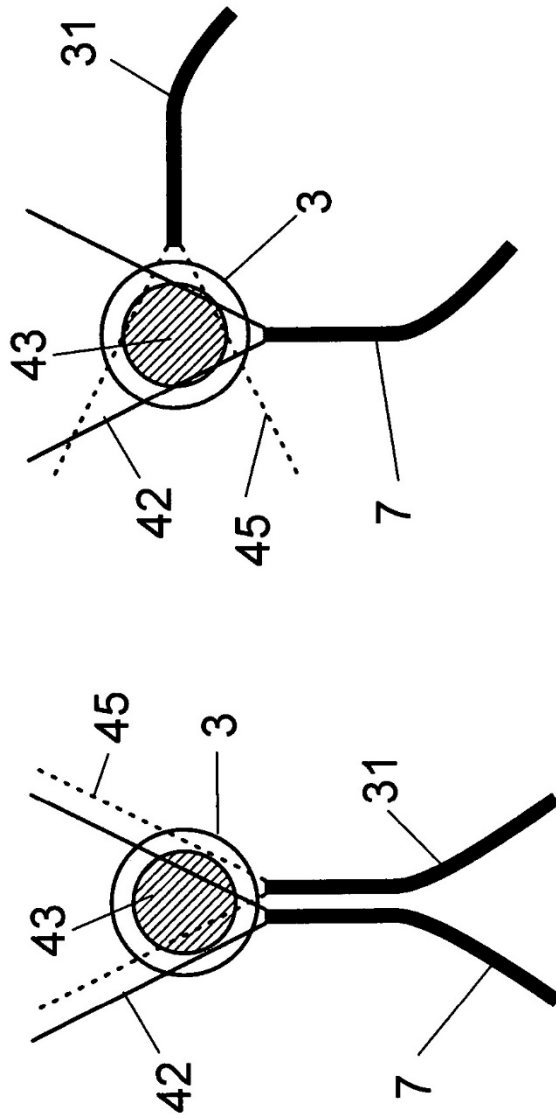


Fig. 18

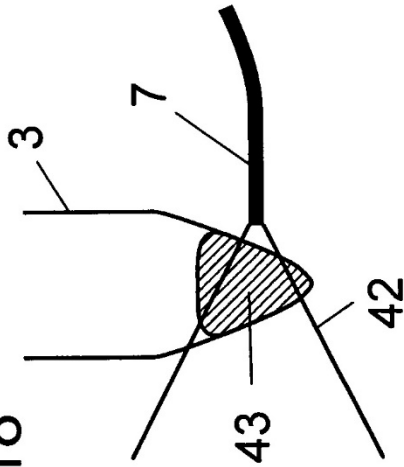


Fig. 17

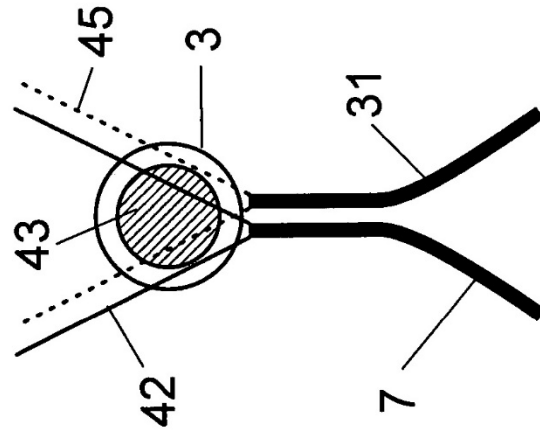


Fig. 16

