



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 270 434**

51 Int. Cl.:
B01L 7/00 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **96114757 .6**
86 Fecha de presentación : **14.09.1996**
87 Número de publicación de la solicitud: **0764468**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **26.03.1997**

54 Título: **Sistema para el tratamiento cíclico de los cambios de temperatura de las muestras líquidas.**

30 Prioridad: **19.09.1995 DE 195 34 632**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.04.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.04.2007

73 Titular/es: **Roche Diagnostics GmbH**
Sandhofer Strasse 116
68305 Mannheim, DE

72 Inventor/es: **Macho, Heinz y**
Bienhaus, Gerhard

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 270 434 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 para el tratamiento cíclico de los cambios de temperatura de las muestras líquidas.

5 **Campo de la invención**

El objetivo de la invención es un sistema para el tratamiento del cambio de temperatura de los ácidos nucleicos, un método para el tratamiento del cambio de temperatura de las muestras líquidas y un método para la detección de un ácido nucleico en una muestra.

10 El ajuste de una determinada temperatura en un líquido es un criterio importante en las reacciones en las que participan componentes activos desde un punto de vista biológico. Si la temperatura no se ajusta de forma correcta, puede ocurrir que una reacción determinada no transcurra o bien únicamente transcurra en un entorno no deseado. Esto es especialmente válido en todas las reacciones en las que intervienen los enzimas. Los enzimas presentan,
15 dependiendo de la temperatura, distintas cinéticas de reacción. Además, la formación de complejos entre elementos de enlace biológicos, por ejemplo, ácidos nucleicos complementarios unos con otros, depende de la temperatura. Por encima de la temperatura de fusión los ácidos nucleicos se presentan en forma de una única hélice y por debajo de dicha temperatura en forma de doble hélice. Para el caso en que pueden transcurrir varias reacciones una tras otra, que exigen diferentes condiciones de temperatura, es conveniente modificar la temperatura del medio de reacción.

20 Hasta el momento esto se hacía de manera que el recipiente en el que se encuentra la mezcla de reacción, se desplazaba entre los baños de líquido a diferente temperatura. De modo que el recipiente se sumergía un tiempo determinado en cada baño, y de esta forma el líquido contenido en el recipiente adquiría la temperatura del medio. Una vez transcurrido el tiempo suficiente para la reacción deseada se transfería el recipiente con el líquido a otro baño de líquido. Estos métodos eran naturalmente muy costosos y difícilmente automatizables.

Recientemente se han desarrollado unos aparatos, en los cuales el recipiente con el líquido que se va a atemperar se dejan en un lugar, no obstante se ha modificado la temperatura del medio. Este procedimiento tiene el inconveniente de que es relativamente costoso en tiempo, porque debe modificarse la temperatura del medio total de enfriamiento. En particular es éste perjudicial en los procesos de enfriamiento.

30 En particular en el sector del diagnóstico de ácidos nucleicos se emplean con frecuencia tratamientos de cambio de temperatura. Por ejemplo, en la reacción en cadena de la polimerasa (EP-A-201184) se modifica cíclicamente la temperatura del medio regulador de la temperatura. Para ello se han descrito los llamados termocicladores (US-A-5.038.852 y EP-A-0 488 769). En este método se calienta y enfría un bloque de reacción de tipo metálico, en el que se observan unas escotaduras para los recipientes de reacción, para conseguir los tratamientos de cambio de temperatura.

40 En la WO 92/07089 se describe un sistema, en el cual el líquido de reacción es transportado en una circulación cerrada entre zonas con elementos de frío o de calor. Sin embargo, el sistema requerido para ello es complicado y poco adecuado para un uso rutinario.

En la anterior DE-A-4409436, no publicada con anterioridad, se describe un método, en el cual se sumerge un elemento de calor y frío combinados en el medio de reacción y la temperatura del medio de reacción únicamente se modifica en la proximidad inmediata del elemento de calefacción.

45 Al realizar un tratamiento para el cambio de temperatura de las muestras líquidas, en particular durante la reacción en cadena de la polimerasa se emplearán temperaturas, en las cuales la presión de vapor del agua es relativamente elevada. Por ello se condensa algo de líquido en la tapa del recipiente de reacción. Sin embargo, puesto que esto conduce a una concentración de los componentes de reacción en la mezcla de reacción, que no es controlable, se ha propuesto integrar en la tapa un calentamiento, de manera que las gotitas de líquido eventualmente depositadas en la tapa puedan pasar de nuevo a la fase gas. Estos calentamientos de la tapa se colocan de manera que únicamente se calientan unas zonas que no se sumergen en la mezcla de reacción.

55 El objetivo de la presente invención consistía en preparar o disponer de un sistema alternativo para el tratamiento del cambio de temperatura de los líquidos.

60 El objetivo de la invención es un sistema para el tratamiento del cambio de temperatura de los líquidos que contienen ácidos nucleicos en un recipiente, donde el sistema contiene un elemento de regulación de la temperatura reevaluable, un recipiente y un elemento de calefacción desechable, de manera que el elemento de calefacción es un componente integrado del recipiente o de una tapa del recipiente y se sumerge para realizar el tratamiento en el líquido.

65 Asimismo el objetivo de la invención es un procedimiento para el tratamiento de ácidos nucleicos en un líquido con el ajuste de 2 o más temperaturas por medio de un elemento de calefacción y de regulación de la temperatura, donde el elemento de regulación es parte de un aparato reevaluable y el elemento de calefacción es parte de un dispositivo desechable.

ES 2 270 434 T3

El sistema conforme a la invención se ha pensado para su uso en dicho método, en el cual un líquido o segmentos del mismo deben ser llevados a distintos niveles de temperatura. Esto es conveniente, por ejemplo, cuando los procesos que deben transcurrir en el líquido, por ejemplo, las reacciones químicas o preferiblemente enzimáticas, se producen únicamente o preferiblemente a determinadas temperaturas. Se han descrito otros procesos que son sensibles a la temperatura como la separación de hélices de ácido nucleico complementarias unas a otras por calentamiento o bien incubación del líquido a una temperatura por encima del punto de fusión correspondiente (T_m) y la formación de híbridos de ácidos nucleicos, que básicamente son complementarios unos a otros a unas temperaturas que se encuentran por debajo del punto de fusión, preferiblemente superiores a 15°C por debajo del punto de fusión, la llamada hibridación. Otro proceso que requiere el tratamiento a una temperatura elevada es la disgregación de los compartimentos celulares. Además se pueden aprovechar temperaturas elevadas para la destrucción de las sustancias inactivables por la temperatura, que se encuentran contenidas en el líquido, por ejemplo, incluso para la inactivación de los enzimas empleados para la disgregación, por ejemplo, las proteinasas. El sistema conforme a la invención permite el ajuste de la temperatura correspondiente o deseada, independientemente de la frecuencia a la que se requiera un cambio de temperatura. Por eso también es posible realizar una o varias de estas etapas una tras otra y varias veces, por ejemplo, de forma cíclica.

Por un tratamiento de cambio de temperatura de un líquido debe entenderse en el sentido de la invención un tratamiento del líquido, en el cual el líquido se trata de manera que los procesos que deben transcurrir en el líquido puedan desarrollarse a distintas temperaturas. Aquí se engloban tanto perfiles de temperatura temporales como perfiles de temperatura locales.

Un ejemplo destacado de la realización múltiple de tratamientos a diferentes temperaturas es la amplificación de los ácidos nucleicos según la reacción en cadena de la polimerasa. Esta reacción es frecuente entre los expertos y se ha descrito en las más diversas modificaciones. Un ejemplo a destacar de una publicación de este tipo es la US-A-4.683.202. La característica esencial de la reacción en cadena de la polimerasa (RCP) es la realización múltiple de ciclos de temperatura, los cuales permiten un tratamiento a elevadas temperaturas, por ejemplo, en una zona entre 90 y 95°C para lograr una sola hélice de ácidos nucleicos de doble hélice, un tratamiento a temperaturas inferiores, por ejemplo en el intervalo entre 50 y 65°C, para la hibridación de cebadores o iniciadores de las secuencias de ácidos nucleicos que se van a amplificar y a una temperatura media, por ejemplo, en un intervalo entre 70 y 75°C, para la prolongación óptima del cebador utilizando el ácido nucleico a amplificar como matriz. Las posibilidades para la variación de los ciclos de temperatura se han descrito, por ejemplo, en EP-A-0 511 712.

Los ácidos nucleicos, que pueden ser sometidos a un tratamiento conforme a la invención, son todos de procedencia natural o bien derivados de bases nucleicas que contienen biopolímeros o análogos, que se obtienen por modificación o bien de la base o del esqueleto de fosfato de azúcar. Los ácidos nucleicos pueden presentarse en el líquido en forma disuelta, en forma enlazada a las células y en una forma enlazada a una superficie sólida (inmovilizada), por ejemplo, en partículas. Es posible pasar los ácidos nucleicos de una forma inmovilizada a la forma disuelta y viceversa, por ejemplo, mediante el calentamiento de los ácidos nucleicos enlazados a una superficie por una sonda inmovilizada.

Como líquidos son en principio especialmente adecuados todos los líquidos que contienen ácido nucleico, por ejemplo, muestras que se han extraído directamente de su entorno primitivo. Como líquidos son especialmente adecuados los que han experimentado un cierto tratamiento, por ejemplo, un paso para eliminar determinados componentes de las muestras (por ejemplo, un análisis posterior de los componentes perturbadores), para licuar la muestra (por ejemplo, en muestras altamente viscosas), o para diluir la muestra, e incluso para el aislamiento del ácido nucleico de una muestra original (por ejemplo, para una limpieza previa).

Como muestras se tienen en cuenta en particular los líquidos corporales como la sangre, orina, esputo o frotis.

El recipiente en el que se realiza el tratamiento del cambio de temperatura se ha fabricado preferiblemente de un material, que no sufre ningún cambio de forma en el tratamiento ni permite que parte componentes del material pasen al líquido. Son especialmente adecuados para ello los plásticos, por ejemplo, polipropileno o poliestireno. Las dimensiones del recipiente se eligen de manera que encajen la muestra y los reactivos que eventualmente se añaden y el elemento de calefacción. Son especialmente adecuados, por ejemplo, los recipientes derivados de las capsulitas Eppendorf. Dichos recipientes se obtienen en el comercio o se fabrican fácilmente mediante un método de moldeo por inyección.

Otro componente esencial del sistema es una tapa, con la cual pueda cerrarse el recipiente. Debería ser adecuada para ello de manera que pudiera mantener en unos límites la entrada y salida de contaminaciones, por ejemplo, por aerosoles. Esta consta también de un material básicamente resistente a la temperatura como el indicado para el recipiente.

Un elemento regulador de la temperatura es un dispositivo que de forma activa puede llevarse a una temperatura deseada, preferiblemente un elemento refrigerante. El elemento refrigerante en el sentido de la invención es un objeto, que se enfría de forma activa y puede absorber calor directa o indirectamente del líquido. No abarca el recipiente. En una primera forma o configuración el elemento refrigerante es, por ejemplo, un bloque de metal, que puede ser enfriado por elementos Peltier (enfriamiento en seco) o bien a través de líquidos refrigerados (enfriamiento del líquido). Siempre que se trate de un bloque metálico, éste se adapta preferiblemente al contorno exterior del recipiente. La adaptación puede ocurrir, por ejemplo, de manera que el elemento refrigerante presente unas escotaduras cilíndricas

ES 2 270 434 T3

huecas, en las cuales puedan introducirse los recipientes. Cuanto mejor es la adaptación del elemento refrigerante a la forma externa del recipiente, tanto mejor es la acción refrigerante. En otra configuración, el elemento refrigerante, preferiblemente un elemento metálico, que sobresale por una abertura, preferiblemente un orificio que se cierra mediante la tapa, está en el recipiente, preferiblemente hasta el nivel de líquido. Aquí se prefiere un enfriamiento por medio de un elemento Peltier. El elemento refrigerante está protegido en este caso por una lámina, por ejemplo, de teflón o de poliéster, de la contaminación directa a través del líquido.

La lámina no se considera como parte del elemento refrigerante, puesto que no es reciclable. El elemento refrigerante, sin embargo, puede ser un baño de agua, en el cual entra el recipiente. El paso del calor se produce del medio refrigerante líquido directamente al medio de reacción a través del recipiente. Un elemento regulador de la temperatura en el sentido de la invención puede tener también una función calefactor, cuando el tratamiento del cambio de temperatura en el líquido requiere una temperatura límite mínima, que básicamente se encuentra más de 5 K por encima de la temperatura ambiente. En este caso puede ocurrir que el transporte del calor a través del elemento regulador al entorno sea tan grande que para obtener la temperatura de percepción mínima deba alimentarse calor. Con todo, la temperatura mínima del elemento regulador alcanzada durante el proceso se encuentra siempre por debajo de la máxima temperatura del elemento de calefacción alcanzada durante el proceso.

Por capacidad de reutilizar o reciclar el elemento refrigerante se entiende la posibilidad de utilizar el mismo elemento refrigerante para el tratamiento de al menos otro líquido. Este otro líquido tiene preferiblemente una composición distinta del primer líquido, de manera debe tenerse en cuenta que se minimiza una contaminación de otro líquido a través del primer líquido. Por este motivo se prefiere la configuración en la que el elemento refrigerante enfría el recipiente desde fuera.

Un elemento calefactor en el sentido de la invención es un objeto, que se calienta de forma activa, y cuya evolución del calor se aprovecha para el calentamiento del líquido que se va a tratar. Puede tratarse de un elemento calefactor de varios componentes. Preferiblemente el elemento calefactor contiene un alambre metálico o una lámina metálica, por ejemplo de oro, o bien un elemento de grafito. Dichos elementos calefactores son conocidos por los expertos. La potencia de calentamiento del elemento calefactor se determina de manera que la temperatura deseada del líquido se alcanza en un tiempo deseado. Esto se puede conseguir, por ejemplo, variando las dimensiones del elemento calefactor, los materiales empleados y la transmisión de la corriente.

Desechable en el sentido de la invención es un elemento que se tira tras llevar a cabo un método para el tratamiento del cambio de temperatura de un líquido determinado. No se emplea para el tratamiento del cambio de temperatura de otros líquidos, que deben someterse a un tratamiento de cambio de temperatura independiente. En particular, en la analítica de dichos líquidos se desecha el elemento calefactor entre cada análisis. Por este motivo se prefieren elementos calefactores de fabricación simple y barata.

Un componente integrado en la estructura en el sentido de la invención es un componente, que no se puede separar sin que no se altere el elemento calefactor o alguna pieza del recipiente o de la tapa. Resulta preferible que el elemento calefactor se integre en el recipiente o en la tapa, lo que aporta ventajas para la fabricación técnica de la fundición por inyección. En una primera configuración, el elemento calefactor puede estar integrado en el recipiente. Para ello debería tenerse en cuenta que el elemento calefactor está localizado en la zona de recepción del líquido, es decir, por ejemplo en la base del recipiente o en la pared lateral del recipiente, que entra en contacto con el líquido que se va a calentar. En la configuración preferida en la que el elemento calefactor es un componente que forma parte de la tapa, el elemento calefactor se fija preferiblemente en el lado interno de la tapa y penetra en el recipiente una vez puesta la tapa hasta por debajo del nivel de líquido. El elemento calefactor o las conexiones, por ejemplo, para la corriente salen hacia fuera por el lado externo y pueden estar provistas de elementos de acoplamiento a un aparato reutilizable par el abastecimiento del elemento calefactor con corriente y si fuera preciso para la regulación de la potencia calorífica.

El sumergir el elemento calefactor en el recipiente se realiza de manera que la parte del líquido que se va a calentar pueda recibir suficiente calor. El elemento calefactor penetra preferiblemente con toda su altura en el líquido.

El sistema conforme a la invención puede contener además de los componentes esenciales que son el recipiente, la tapa, el elemento calefactor y el elemento refrigerador otros elementos adecuados para realizar los tratamientos de cambio de temperatura de los líquidos y si fuera preciso las etapas de tratamiento ulterior. Aquí se hace referencia especialmente a elementos para la alimentación de los elementos calefactor y refrigerante con medios refrigerantes o corriente, elementos para regular la temperatura, elementos para medir la temperatura, unidades para el transporte de recipientes, elementos para el pipeteado de líquidos en el recipiente y fuera del recipiente y elementos para el control de todo el sistema. El sistema contiene preferiblemente una multitud de recipientes y tapas, de manera que es adecuado para el tratamiento de una diversidad de líquidos (en particular que contienen ácido nucleico) en serie o/y en paralelo.

Respecto al calentamiento y enfriamiento del líquido son posibles dos configuraciones especiales. En una primera configuración o forma de trabajo el elemento calefactor es activo a intervalos, por ejemplo, el líquido se calienta solamente intervalos de segundos, mientras que el enfriamiento tiene lugar de forma permanente. Debido a ello se forman en el líquido distintos gradientes de temperatura, de manera que las temperaturas cerca del elemento refrigerante se mantienen esencialmente constantes, mientras que la temperatura del líquido cerca del elemento calefactor varía mucho. Con ello se puede conseguir, por ejemplo, que en regiones muy distintas transcurran diferentes reacciones en el mismo recipiente. Por ejemplo, en el caso del calentamiento del elemento calefactor a las temperaturas requeridas para

ES 2 270 434 T3

la desnaturalización de los ácidos nucleicos (por encima del valor T_m), tenía lugar una desnaturalización únicamente en la proximidad del elemento calefactor, por lo que los ácidos nucleicos desnaturalizados podían ser transportados a zonas, en las que se podía producir una hibridación con otros ácidos nucleicos. Este transporte puede ocurrir, por ejemplo, por convección, sin embargo es preferible que sea por difusión.

5 En una segunda configuración o forma de ejecución especialmente preferida, se mantienen de forma permanente tanto la calefacción como el enfriamiento y preferiblemente de forma constante. Con ello se crea un gradiente de temperatura más estable con una actividad suficientemente mayor, que es controlado por la capacidad conductora del calor del líquido así como por la difusión y si fuera preciso convección en el líquido. Aquí también pueden transcurrir
10 distintas reacciones en diferentes regiones del recipiente. En esta configuración todos los componentes, que deben participar en las reacciones respectivas, están preferiblemente disueltos en el líquido.

En una configuración preferida el sistema consta además de una multitud de tapas y recipientes básicamente de un bloque regulador de la temperatura así como de elementos para preparar y regular la energía eléctrica para el
15 funcionamiento del elemento calefactor.

El bloque regulador de la temperatura es un cuerpo preferiblemente metálico con unas escotaduras para colocar los recipientes de plástico. La potencia reguladora de la temperatura necesaria viene suministrada por el empleo de líquidos reguladores de la temperatura (líquido del soporte calorífico, circulación-enfriamiento), empleo de elementos
20 Peltier o bien los conocidos métodos de regulación de la temperatura.

Las dimensiones de las escotaduras para los recipientes de plástico se basan firmemente en las dimensiones externas de los recipientes de plástico, necesitándose el contacto directo del bloque regulador de la temperatura y del recipiente de plástico para el paso adecuado del calor. Las características del diseño son bien conocidas por los expertos.

Preferiblemente la profundidad de la cavidad debería estar en una relación de 5:1 respecto al diámetro, puesto que con ello tiene lugar una circulación del líquido favorable para el sistema con la formación de gradientes de temperatura.

El recipiente de plástico, en el cual tiene lugar el tratamiento continuado del cambio de temperatura, es preferiblemente de polipropileno con un grosor de pared inferior a 1,0 mm (sin embargo depende del volumen total de la solución de reacción).

En los procesos de reacción en el campo de las aplicaciones en Química Clínica y en el diagnóstico del ácido nucleico se emplean volúmenes generalmente inferiores a 1 ml. Las dimensiones aproximadas para el recipiente son de 8 mm de diámetro interior y de 40 mm de altura.

Para evitar impurezas de la solución de reacción y para impedir pérdidas de evaporación el recipiente se cierra con una tapa, igualmente de polipropileno.

El elemento de calefacción desechable consta preferiblemente de un material moldeado de plástico, de conexiones eléctricas así como de una lámina conductora del calor. Las dimensiones del elemento de calefacción desechable se adaptan a las dimensiones del recipiente de reacción.

Una forma de ejecución preferida del elemento de calefacción desechable consiste en que en una pieza de plástico fabricada en un método de fundición por inyección, que consta de tapa y soportes, se integra un dispositivo previamente fabricado a base de una lámina conductora del calor y de unos contactos.

La lámina conductora del calor es preferiblemente una lámina de oro de 20 μm de grosor. El plástico empleado para la pieza de fundición por inyección es el polipropileno. La superficie del elemento calefactor activo es preferiblemente de unos 60 mm^2 , el final inferior del elemento llega hasta el suelo del recipiente en el recipiente de reacción.

El sistema anteriormente ilustrado para el tratamiento del cambio de temperatura de los líquidos que contienen ácidos nucleicos puede emplearse preferiblemente de múltiples formas.

55 Igualmente el objeto de la invención es por tanto un método para el tratamiento de ácidos nucleicos en un líquido ajustando dos o más temperaturas por medio de un elemento refrigerante y uno de calefacción, donde el elemento refrigerante es parte de un aparato reciclable y el elemento calefactor es parte de un dispositivo desechable. Las características preferidas anteriormente mencionadas sirven también para este método. Se ha demostrado que es especialmente conveniente el uso del método conforme a la invención en las reacciones de tipo termocíclicas. En dichos
60 métodos tienen lugar reacciones distintas a temperaturas diferentes. Las reacciones pueden transcurrir cuando los reactivos se someten a unas determinadas temperaturas. Esto puede ocurrir, por un lado, tal como se ha descrito, mediante la variación temporal del perfil de temperatura en la mezcla de reacción incrementando o disminuyendo la potencia refrigerante o calorífica, pero también por otro lado estableciendo un perfil de temperatura constante entre las zonas calentadas y las zonas enfriadas. Pueden concebirse formas de paso, producidas por las convecciones de la mezcla.

65 Es esencial que los reactantes de la reacción deseada sean expuestos uno tras otro a las distintas temperaturas según el método conforme a la invención, de manera que puedan transcurrir las distintas reacciones deseadas. Durante todo el periodo de tratamiento se puede conseguir, por ejemplo, para las reacciones cíclicas, una potencia calorífica o refri-

gerante mediante el control de la potencia calorífica o refrigerante, de forma que los reactantes puedan ser sometidos a diferentes condiciones de reacción y por tanto se realicen ciclos de reacción uno tras otro. Fijando un gradiente de temperatura relativamente constante en la mezcla de reacción, el tratamiento tiene lugar preferiblemente por difusión del elemento de la reacción de un primer segmento de la mezcla de reacción con una primera temperatura a un segundo segmento espacial con una segunda temperatura. Por difusión en un segmento espacial con una temperatura, como la que necesita la reacción siguiente (por ejemplo, que se repite a una primera o tercera temperatura) tiene lugar la ejecución del ciclo. Puesto que los procesos de difusión habitualmente tienen lugar de forma lenta, resulta preferible elegir un gradiente de temperatura relativamente inclinado, es decir, preocuparse de que las caídas de temperatura entre el elemento calefactor y el elemento refrigerante se limiten a un recorrido relativamente corto. Los recorridos típicos entre el elemento refrigerante y el calorífico son de pocos milímetros.

Un ejemplo típico de un método para el tratamiento del cambio de temperatura de los ácidos nucleicos es la amplificación de ácidos nucleicos o partes de los mismos. Un ejemplo de ello es la reacción en cadena de la polimerasa, como la que se ha descrito en US-A-4.683.202. Otro ejemplo es la reacción en cadena de la ligasa.

Otro objetivo de la invención es un método para la detección de un ácido nucleico de una muestra mediante

- a) la liberación del ácido nucleico, en el que debe basarse la detección, de los compartimentos en los cuales se encuentra contenido, en un recipiente en un sistema conforme a la invención,
- b) aumento de las informaciones de secuencia, basada en la presencia de ácido nucleico en el recipiente y
- c) detección de informaciones de secuencia,

El sistema conforme a la invención se puede emplear por tanto para simplificar fácilmente el método de detección de ácidos nucleicos. Se prefiere especialmente que el líquido exceptuando los procesos de mezcla no sea transportado por dentro del recipiente de un lugar a otro.

La liberación de ácidos nucleicos puede producirse en un principio de forma conocida. Los tratamientos habituales contienen la lisis de las paredes celulares, por ejemplo, mediante reacciones adecuadas, como la proteínasa K, detergentes o álcalis o/y por calentamiento. Esto hace que los ácidos nucleicos se presenten en solución y accesibles para los reactivos. Esta etapa tiene lugar en un recipiente, que es inerte frente a las condiciones de reacción de la liberación y de la etapa siguiente b), por ejemplo, el polipropileno. En el mismo recipiente, aumenta ahora la información de secuencia, que se basa en la existencia de ácido nucleico en el recipiente, por ejemplo, por amplificación de una zona parcial del ácido nucleico liberado. Esto puede ocurrir, por ejemplo, por la reacción en cadena de la polimerasa.

Por información de secuencia se entiende la secuencia de bases, por ejemplo, la (secuencia del nucleótido) de una parte o de la totalidad del ácido nucleico que se va a detectar.

En principio la información de secuencia puede consistir en una secuencia de nucleótidos, que se acopla a través de una reacción de enlace al ácido nucleico que se va a detectar y seguidamente es amplificada. Por ejemplo, puede tratarse de la llamada amplificación de señal. Básicamente el objetivo de la invención es que tengan lugar las reacciones de las etapas a) y b) en el mismo recipiente. La etapa b) puede iniciarse, por ejemplo, de manera que el líquido que contiene ácidos nucleicos en el recipiente se someta a un tratamiento de cambio de temperatura con ayuda del elemento regulador de la temperatura reciclable anteriormente mencionado en particular el elemento refrigerante, y el elemento calorífico desechable. La mejor manera de que esto ocurra será que el recipiente se guarde en el elemento refrigerante reutilizable durante las etapas a) y b) y para la realización de la etapa b) el elemento calorífico desechable se introduzca en el recipiente. Cuando el elemento calorífico desechable se encuentra integrado en una tapa, ésta puede encontrarse incluso durante la etapa a) sobre el recipiente y ser empleada para el tratamiento calorífico durante y después de la liberación del ácido nucleico.

La detección de la información de secuencia puede producirse según un método en principio conocido, por ejemplo, en el paso de la mezcla de reacción de la etapa b) a un recipiente, en el que los ácidos nucleicos formados se detectan preferiblemente por medio de una reacción de hibridación. Un método de análisis posible aprovecha el llamado principio de Sándwich, tal como se describe en EP-B-0 079 139. Este método utiliza una sonda de freno o retenida complementaria a la información de secuencia amplificada, que está o puede estar unida a una fase sólida, y una sonda de detección que está marcada y es complementaria a otra parte de la información de secuencia amplificada. La formación del complejo de sondas y la información de secuencia amplificada que contiene ácidos nucleicos se emplea para señalar la presencia de ácidos nucleicos en la muestra. Evitando el paso de ácidos nucleicos de un recipiente a otro se reduce considerablemente el peligro de una contaminación de la mezcla de reacción y del entorno. Además el método es naturalmente mucho más simple y practicable si se utilizan menos aparatos.

En la figura 1 se muestra una tapa (1) conforme a la invención con un elemento calefactor integrado. Puede verse que la tapa presenta una pieza de cierre (3), que se adapta a la forma del orificio del recipiente que se va a cerrar. La pieza de cierre sigue en un soporte de plástico (6) para el elemento calefactor (5). En la superficie de este soporte de plástico se fija el elemento calefactor de manera que las conducciones (4) para el elemento calefactor quedan en el interior del soporte de plástico o bien de la pieza de cierre y terminan en un extremo en el contacto eléctrico (2) para la conexión a un abastecimiento de corriente.

ES 2 270 434 T3

En la figura 2 se visualiza la tapa en una forma que cubre un recipiente. En la figura 2 se muestran también las dimensiones externas de un recipiente y de la tapa visualizada en la figura 1. Estas dimensiones son adecuadas para la realización de un método conforme a la invención, para la realización de un método de amplificación, pero el experto las adapta de forma simple a unas cantidades de líquido variables. El recipiente viene caracterizado por la referencia (7).

En la figura 3 se visualiza un sistema conforme a la invención con un módulo de tratamiento de muestras 17, con el cual puede realizarse una preparación de los líquidos que contienen ácido nucleico para la amplificación y la propia amplificación. En esta figura, el manipulador superior (manipulador de la tapa 11) puede agarrar la tapa de la figura 1 (Top 1) y colocarla sobre los recipientes de reacción preparados (desechables 12). En el manipulador superior se han integrado además los contactos para la fuente de corriente de calefacción de la tapa. Con ayuda de la unidad de pipeteado y de las puntas de pipetas (desechables tips 13) se pueden transportar los reactivos 14 o /y líquidos de prueba 15 a los recipientes de reacción 7 (aquí desechables 12). Tan pronto como se coloca la tapa conforme a la invención, éste se puede transportar a un recipiente de descarga 16 (solid phase disposable with top). Es preferible que todos los procesos se realicen en un aparato, en el que puedan tener lugar los procesos de transporte y pipeteado en todas las 3 direcciones espaciales (x, y, z) (por ejemplo, robots de laboratorio 18).

En la figura 4 se visualiza un sistema con conexión de corriente (8), contactos eléctricos (2), mezcla de reacción (9), que se agita por convección mediante el desarrollo de calor del elemento calorífico, recipiente (7) y bloque de enfriamiento (10).

En la figura 5 se muestra un esquema de la realización de un ensayo con tratamiento del cambio de temperatura.

Lista de referencia

- 1 Tapa con elemento calefactor desechable
- 2 Contactos eléctricos
- 3 Pieza de cierre de la tapa
- 4 Conducción eléctrica para el elemento calorífico (que penetra en el interior del plástico)
- 5 Elemento de calefacción (lámina de oro)
- 6 Soporte de plástico para el elemento de calefacción
- 7 Recipiente
- 8 Conexión de corriente
- 9 Mezcla de reacción
- 10 Elemento refrigerante
- 11 Manipulador de la tapa (agarrado, retirada, colocación de la tapa, alimentación de corriente por los contactos)
- 12 Dispositivos desechables (contienen una multitud, por ejemplo, 16 recipientes, enlazados unos con otros)
- 13 Puntas de pipetas en un brazo de pipeteado del aparato
- 14 Reactivos en el recipiente
- 15 Líquido de prueba en el recipiente
- 16 Recipiente de residuos para la tapa
- 17 Módulo de preparación de muestras (soporte para recipientes, bloque regulador de la temperatura)
- 18 Robots de laboratorio (con regulación de las etapas de transporte y de regulación de la temperatura, control del proceso)
- 19 Unidad de control para el elemento de calefacción
- 20 Ordenador de registro y evaluación de todo el proceso

ES 2 270 434 T3

Ejemplo 1

Ajuste de un sistema para la realización de un análisis del ADN

5 El sistema está compuesto de un baño de agua, que se regula a una temperatura de 57°C. Sobre la superficie del agua se fija una plancha matriz de agujeros a una distancia, de manera que el recipiente de reacción según la figura 2 se sumerja aproximadamente la mitad dentro del agua. Un reborde en el recipiente impide que éste se deslice en el agua. Las escotaduras de alojamiento de la plancha de agujeros son escasamente mayores de 8 mm. El recipiente de plástico es de polipropileno con un grosor de pared de 0,4 mm (figura 2).

10 El elemento de calefacción empleado se representa esquemáticamente en la figura 1. Se trata de una pieza de plástico fabricada en un proceso de fundición por inyección, en el cual se han integrado una lámina de oro de 20 µm de grosor y unas conducciones de calor, de manera que la lámina de oro se moja con el líquido por un lado.

15 Ejemplo 2

Realización de un análisis de ADN con gradientes de temperatura estáticos

1. Preparación de muestras /aislamiento del ADN

20 El ADN de los leucocitos del ser humano se aislaba según el método siguiente partiendo de sangre entera mediante el uso del estuche QIAamp Blood (nr. 29104) de la empresa Quiagen (BRD, Postfach, 40719 Hilden).

25 En un recipiente Eppendorf de 2 ml se pipeteaban 200 µl de EDTA-sangre entera anticoagulada, 25 µl de proteína - solución K (19 mg/ml) y 200 µl de solución tampón. La muestra se agitaba inmediatamente por medio de Vortex®, para volver a suspender el sedimento celular formado. La muestra se calienta durante 10 minutos a 70°C, luego se enfría a temperatura ambiente y se guarda con 210 µl de isopropanol. La muestra se transfiere a una “spin-column” QIAamp. La “spin-column” es un dispositivo de centrifugación /tubito abierto hacia abajo, en cuya base se encuentra un vellón de fibra de vidrio.

30 La “spin-column” se fija a un recipiente de Eppendorf de 2 ml de entrada de muestra y se centrifuga en una centrífuga de mesa a 6.000xg (=8.000 rpm) durante 1 minuto. El filtrado se tira y se pipetea 500 µl de solución tampón de lavado en la “spin-column”. Se centrifuga de nuevo 1 minuto a 6.000 x g. El filtrado se desecha y el proceso de lavado se repite de nuevo.

35 Después se pipetea 200 µl de la solución de elución (Tris/HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) en la “spin-column” y el ADN enlazado es eluido del vellón de fibra de vidrio por medio de una nueva centrifugación (1 minuto a 6.000xg).

40 El ADN purificado es caracterizado por medio de la medición de la extinción en un fotómetro a 260 nm y 280 nm y por medio de la electroforesis del gel. De 200 µl de sangre entera (aproximadamente 5 x 10⁶ leucocitos por ml), se obtienen unos 6 µg de ADN en 200 µl de la solución de elución (lo que corresponde a aprox. 30 ng de ADN/µl) con un coeficiente de extinción A₂₆₀/A₂₈₀ de 1,7-1,9 (una extinción de 1000 mE a 260 nm corresponde a un contenido en ADN de la muestra de 50 ng/µl).

45 El tamaño de los fragmentos de ADN eluido se sitúa entre 1 y 50 Kbp, principalmente entre 20 y 40 Kbp, determinado por medio de la electroforesis del gel en un gel de azarosa al 1% (coloración de bromuro de etidio).

2. Amplificación / reproducción del ADN

50 Por medio de dos cebadores específicos se amplifica una secuencia del gen-tPA-humano (tPA= activador del plasminógeno tipo tisular). Las secuencias del cebador empleado son:

Forward (es decir, “upstream”)

55 SEQ.ID.NO.1: 5'-AGA CAG TAC AGC CAG CCT CA-3'

Reverse (es decir, “downstream”)

60 SEQ.ID.NO.2: 5'-GAC TTC AAA TTT CTG CTC CTC-3'

Utilizando este par de cebadores se forma un amplificado con una longitud de 375 bp.

Se pipetea la mezcla master siguiente en un recipiente de reacción de polipropileno anteriormente descrito (PCR):

65 10 µl 10 veces tampón PCR con MgCl₂ (100 mM Tris HCl pH 8,9; KCl 500 mM, MgCl₂ 15 mM)

2 µl de mezcla dNTP 10 mM (es decir, dATP, dGTP, dCTP y dTTP 10 mM, respectivamente)

ES 2 270 434 T3

0,5 μ l de Taq-polimerasa (5 U/ μ l)

1 μ l de cebador Forward (30 μ M, secuencia ver antes)

5 1 μ l de cebador reverse (30 μ M, secuencia ver antes)

82,5 μ l agua bidestilada, en autoclave

10 Los reactivos empleados en total para la amplificación (a excepción del cebador) proceden del estuche PCR Core (nr. 1578 553) de Fa. Boehringer Mannheim.

15 La mezcla master ($\Sigma= 97 \mu$ l) se centrifuga ligeramente en una centrifuga de mesa y luego se añaden con pipeta 3 μ l de muestra que contiene ADN (del punto 1, contenido en ADN aproximadamente 30 ng/ μ l). El recipiente de PCR se coloca en un bloque calefactor /refrigerante conforme a la invención y se cierra con una tapa que contiene un elemento calorífico desechable.

20 El elemento calorífico de la tapa se coloca de manera que el cable de calefacción está metido en la mezcla PCR hasta dos terceras partes. El elemento de calefacción se conecta a la alimentación de voltaje y la mezcla PCR se incuba así aproximadamente ½ hora, de manera que se ajusta en el cable de calefacción en el tubo una temperatura de 95°C y en la pared interior del tubo una temperatura de 58°C.

Una vez finalizada la amplificación la mezcla PCR se analiza según el punto 3.

25 *3. Análisis del amplificado de ADN*

En la bolsa de muestras de un gel de agarosa del 1% se cargan 10 μ l de amplificado de PCR del punto 2. En una bolsa de muestras colindante se colocan 800 ng del estándar longitudinal de ADN VI de Boehringer (nr. 1062 590, tamaño del fragmento 2176 bp hasta 154 bp).

30 El gel se desarrolla durante 2 horas en un campo de tensión y luego se analiza en una mesa de UV.

En presencia de leucocitos-ADN humanos en la mezcla master resulta visible en el gel una banda de ADN intensiva (375 bp.), cuya posición se encuentra entre la banda 394 bp y la banda 298 p del estándar longitudinal VI.

35 Ejemplo 3

Tratamiento del cambio de temperatura con gradientes de temperatura que varían periódicamente

40 El objetivo de este experimento es averiguar y optimizar un gradiente de temperatura que varía de forma periódica con un sistema conforme a la invención. Para ello se colocaba un tubo de reacción de polipropileno, que se llenaba con 300 μ l de agua bidestilada y tratada en autoclave, en un bloque metálico regulador de la temperatura, que se enfriaba sobre elementos Peltier. En la tapa se integraba un Chip-Pt24 disponible en el comercio, que al mismo tiempo servía de elemento calefactor y de sensor de la temperatura. El elemento calefactor se introduce en el agua. En un tubo de reacción colindante se controlaba el ajuste y el mantenimiento de la temperatura estándar (temperatura del
45 bloque de atemperado) con un dispositivo medidor de la temperatura M 4011 BBC. En la figura 5 se representa esquemáticamente el ensayo. Este montaje funcionaba empleando intervalos distintos de temperatura. Como unidad se caracteriza el periodo de tiempo en que la calefacción es activa y como tiempo se define el intervalo de tiempo entre los ciclos de calentamiento. En las figuras 6 hasta 12 se indican los resultados de los ensayos. Puede verse que la
50 realización conforme a la figura 12 no hacía posible ningún tratamiento de cambio de temperatura ya que los tiempos son suficientemente razonables para una rehibridación de los ácidos nucleicos. Con ayuda de estos ensayos un experto puede averiguar las mejores condiciones para un sistema especial (geometrías especiales, potencias de calentamiento, etc.) para su determinación.

55

60

65

ES 2 270 434 T3

TABLA 1

Temp estand. °C	Temp.total °C	Unidad/ms	Tiempo/ms	Anexo nr.
4	4,9	800	2000	FIG 6
10	11,0	400	2000	FIG 7
10	10,6	800	2000	FIG 8
10	11,0	800	3000	FIG 9
10	10,9	800	4000	FIG 10
20	20,2	800	3000	FIG 11
20	20,5	2000	1000	FIG 12

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 270 434 T3

REIVINDICACIONES

5 1. Sistema para el tratamiento del cambio de temperatura de los líquidos que contienen ácidos nucleicos en un recipiente (7), donde el sistema contiene un elemento regulador de la temperatura reciclable (10), un recipiente o depósito (7) y un elemento calefactor desechable (5), de manera que el elemento calefactor (5) es un componente integrado del recipiente (7) o de una tapa (1) y se sumerge para realizar el tratamiento en el líquido.

10 2. Utilización de un sistema conforme a la reivindicación 1 para el tratamiento de ácidos nucleicos en un líquido mediante el ajuste de dos o más temperaturas por medio del elemento calefactor y refrigerante.

3. Uso conforme a la reivindicación 2, que se **caracteriza** porque el dispositivo desechable es la tapa de un recipiente.

15 4. Uso conforme a la reivindicación 2 ó 3, que se **caracteriza** porque el elemento calefactor durante el proceso de calefacción se sumerge en el líquido.

5. Método para detectar un ácido nucleico en una muestra mediante

20 a) liberación del ácido nucleico que va a ser la base para la detección de los compartimentos en los que se encuentra, en un depósito en un sistema conforme a la reivindicación 1,

b) información de la secuencia de replicación que se basa en la presencia del ácido nucleico en el recipiente y

25 c) determinación de la información de la secuencia

6. Método conforme a la reivindicación 5, que se **caracteriza** porque la información de la secuencia se repite en ciclos de temperatura.

30 7. Método conforme a la reivindicación 5, que se **caracteriza** porque los ciclos de temperatura se forman con ayuda de un elemento de calefacción y refrigeración donde el elemento de calefacción es parte de un dispositivo desechable.

35

40

45

50

55

60

65

Fig.1

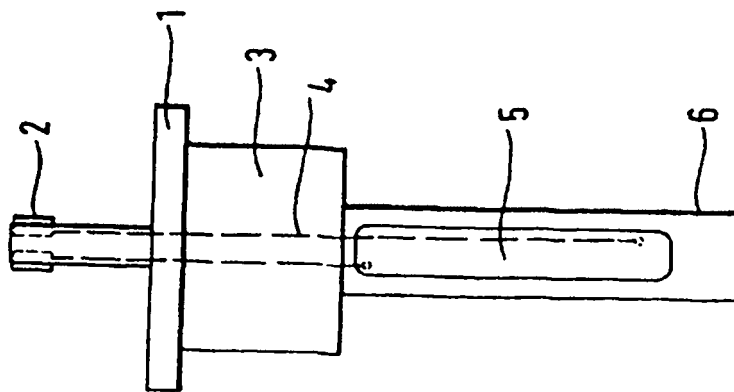


Fig.2

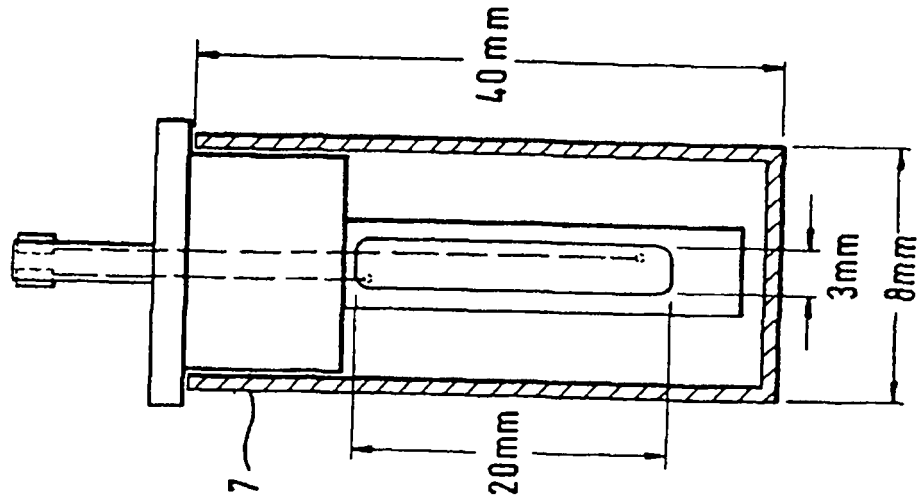


Fig. 3

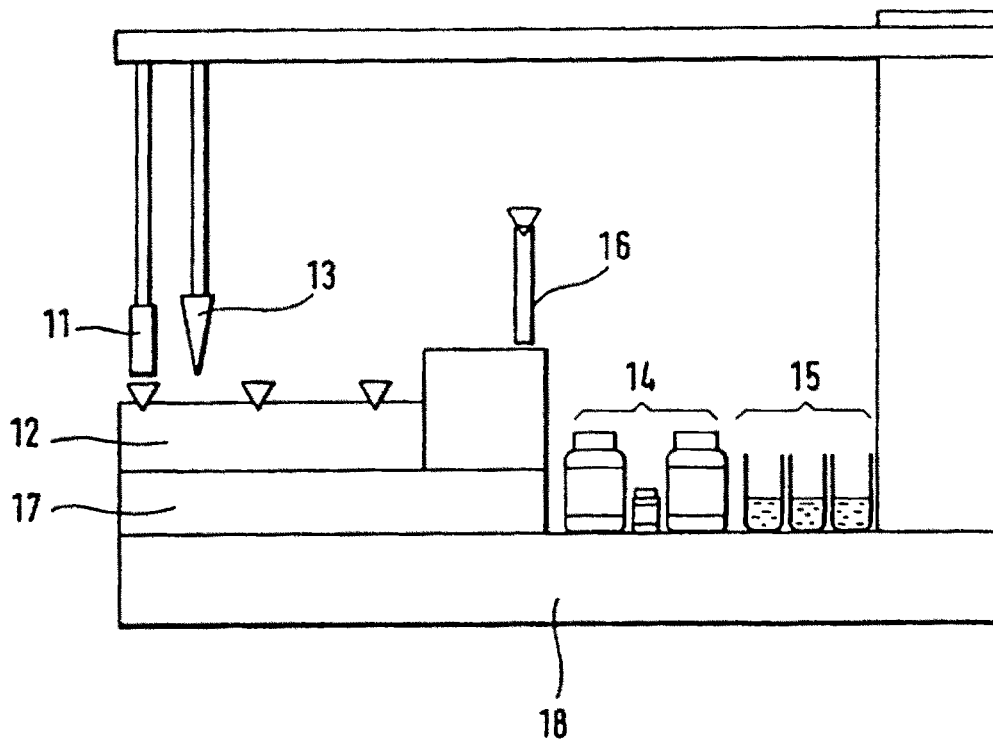


Fig. 4

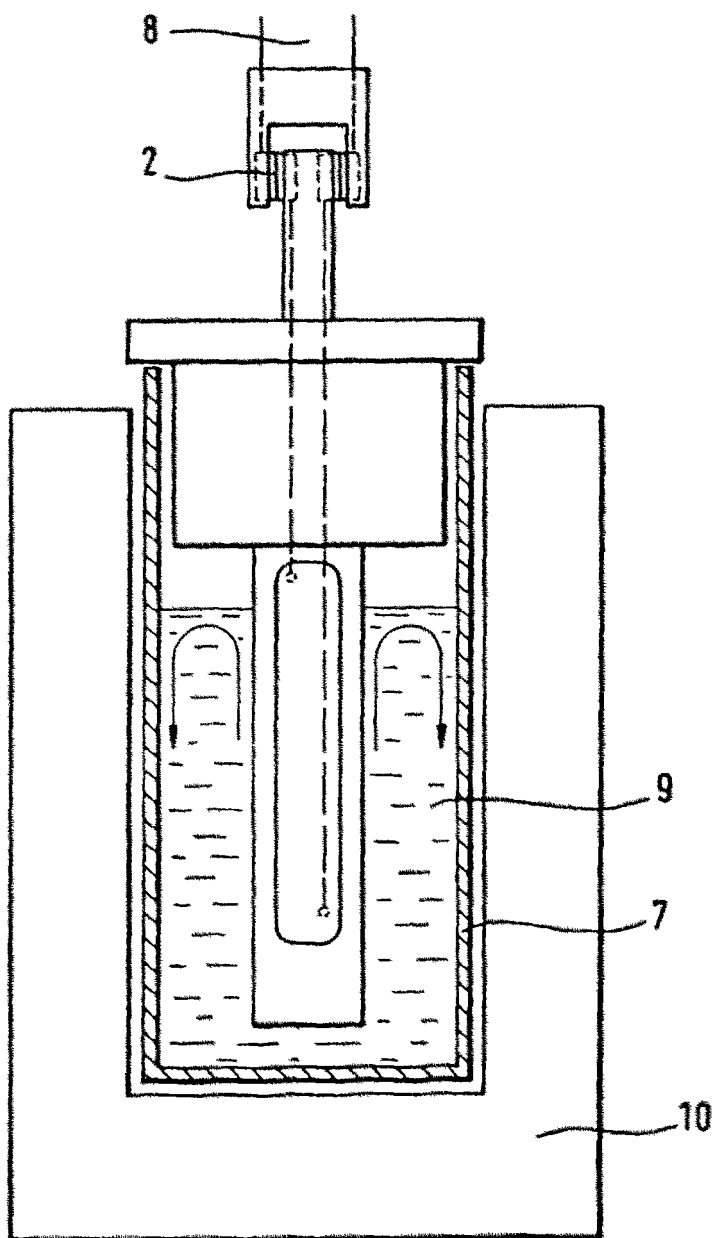


Fig. 5

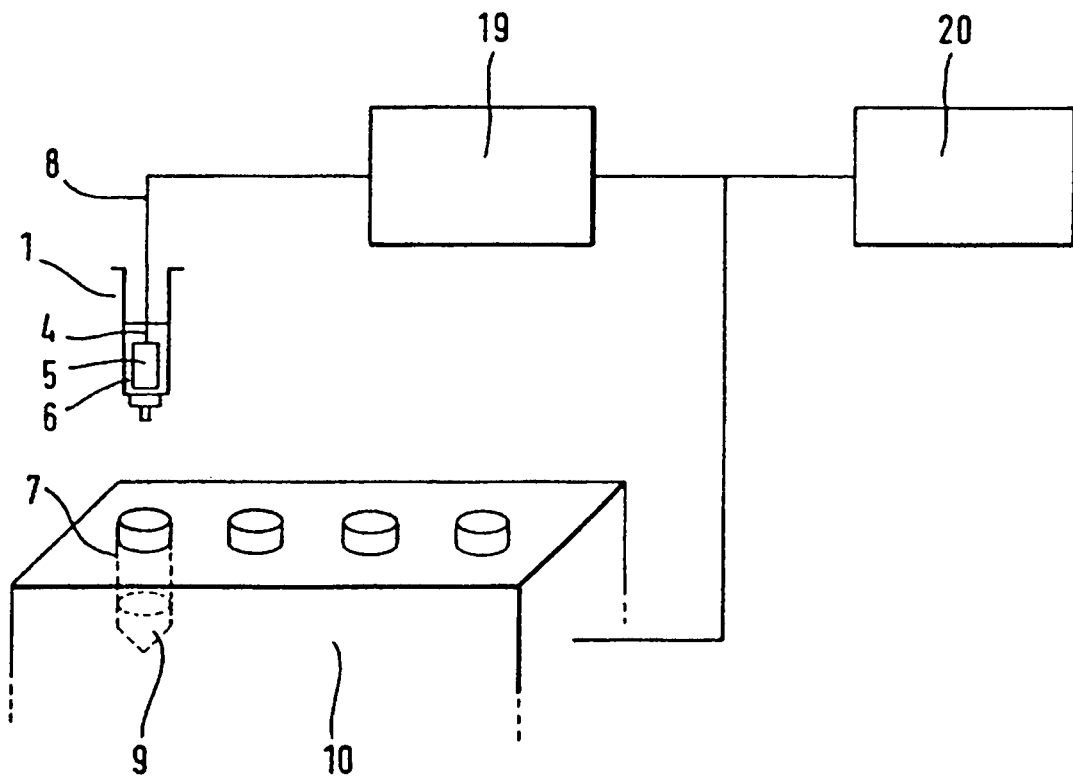


Fig. 6

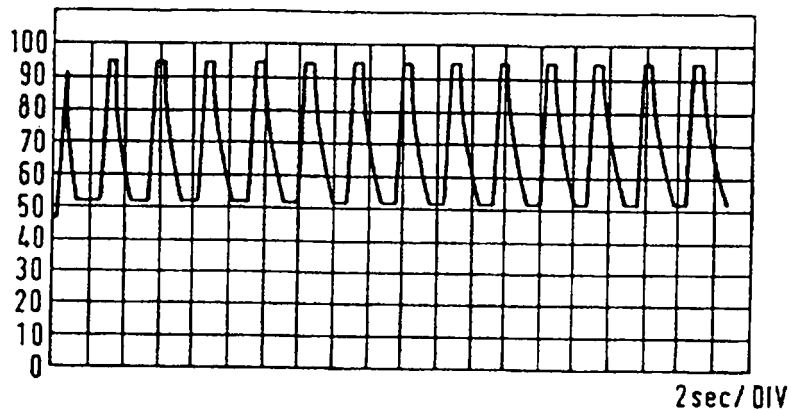


Fig. 7

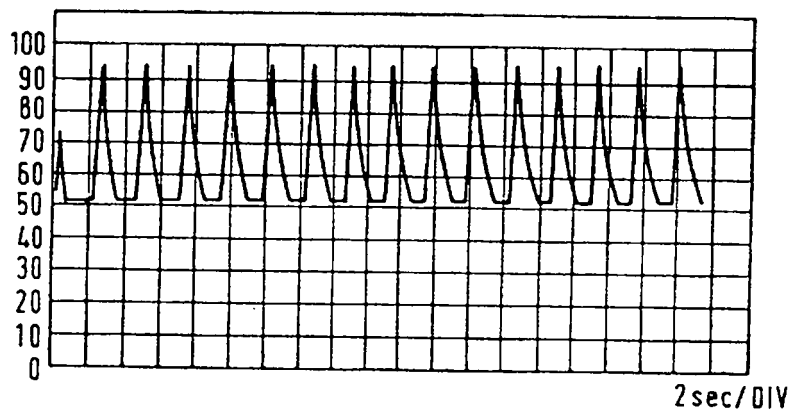


Fig. 8

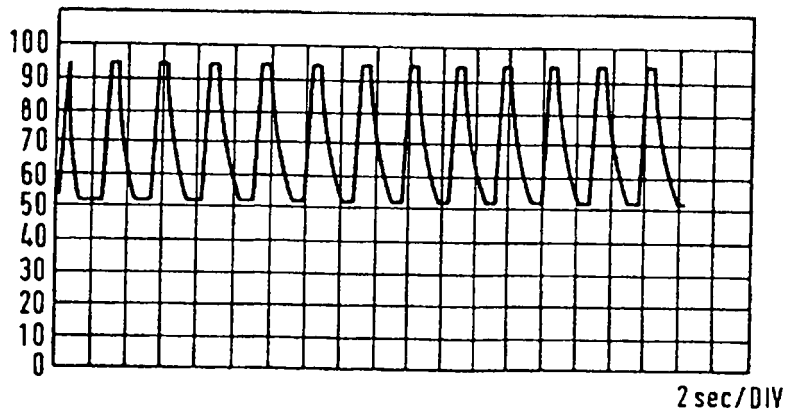


Fig. 9

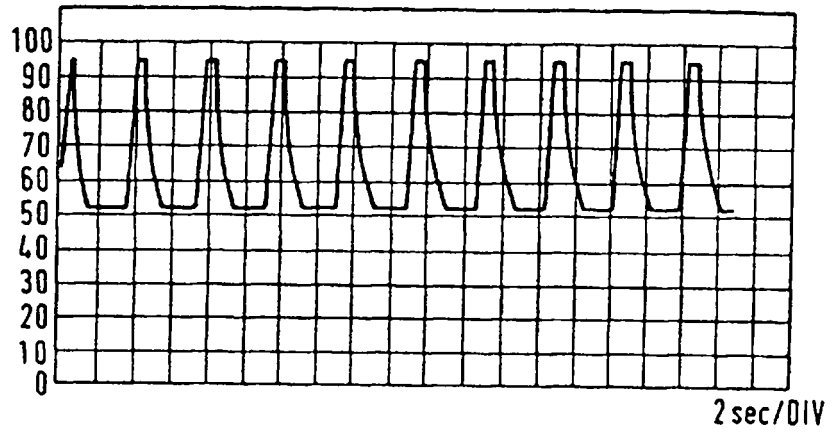


Fig. 10

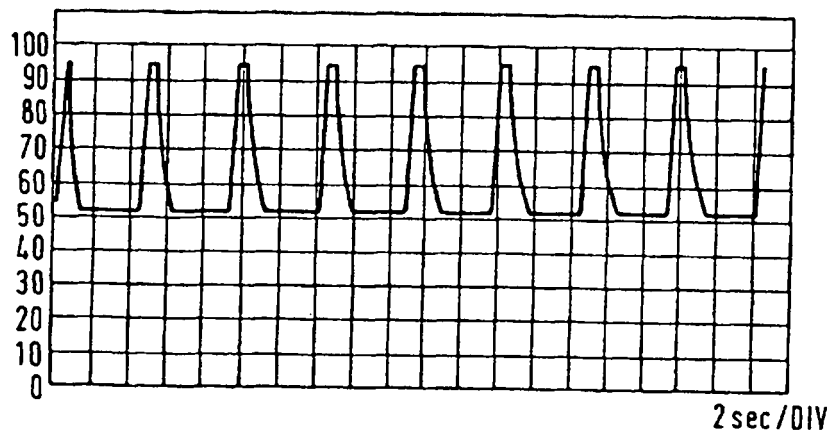


Fig. 11

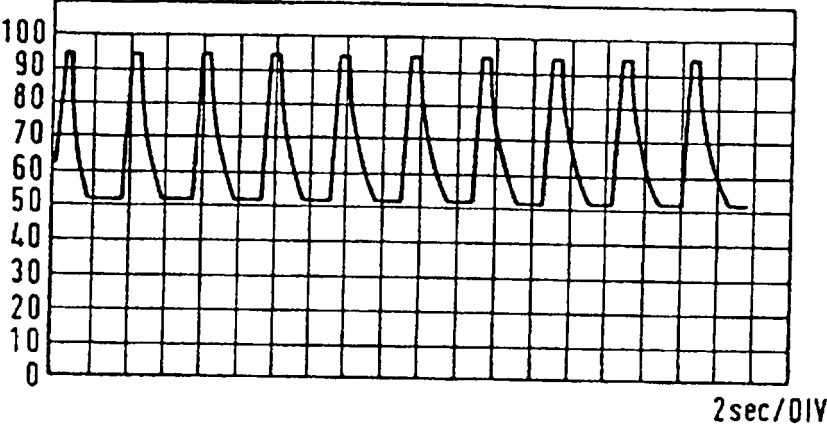
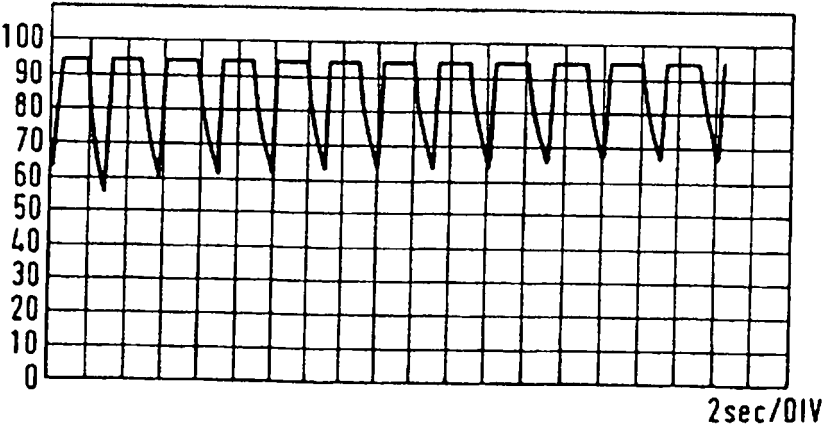


Fig. 12



ES 2 270 434 T3

LISTA DE SECUENCIAS

(1) DATOS GENERALES

- 5 (i) SOLICITANTE:
- (A) NOMBRE: Boehringer Mannheim GMBH
 - (B) CALLE: Sandhoferstr. 116
 - 10 (C) LUGAR: Mannheim
 - (D) PAIS: Alemania
 - (E) CODIGO POSTAL: 68305
 - (F) TELEFONO: 0621 759 4348
 - 15 (G) TELEFAX: 0621 759 4457
- (ii) DEFINICIÓN DEL HALLAZGO: Sistema para el tratamiento del cambio de temperatura de muestras líquidas
- 20 (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 2
- (iv) VERSIÓN LEGIBLE INFORMÁTICA:
- (A) SOPORTE DE DATOS: floppy disk
 - 25 (B) ORDENADOR: IBM PC compatible
 - (C) SISTEMA DE FUNCIONAMIENTO: PC-DOS/MS-DOS
 - (D) SOFTWARE: PatentIn Release # 1.0 versión # 1,30(EPA)

30 (2) DATOS RESPECTO A LA SEQ ID NO:1:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 20 pares de bases
 - 35 (B) TIPO: Nucleótidos
 - (C) FORMA DE HÉLICE: Una sola hélice
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- 40 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: Ácidos nucleicos variados
- (A) DESCRIPCIÓN: = oligodesoxiribonucleótido
- (iii) HIPOTÉTICAMENTE: BO
- 45 (iv) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO 1:

AGACAGTACA GCCAGCCTCA

20

50 (3) DATOS RESPECTO A LA SEQ ID NO:2:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (E) LONGITUD: 21 pares de bases
 - 55 (F) TIPO: Nucleótido
 - (G) FORMA DE HÉLICE: Una sola hélice
 - (H) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: Ácidos nucleicos variados
- 60 (A) DESCRIPCIÓN: = oligodesoxiribonucleótido
- (iii) HIPOTÉTICAMENTE: NO
- 65 (iv) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO 2:

GACTTCAAAT TTCTGCTCCT C

21