

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 885 680**

51 Int. Cl.:

G02B 21/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.03.2014 PCT/US2014/021317**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.09.2014 WO14149875**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.03.2014 E 14767665 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.08.2021 EP 2972549**

54 Título: **Sistema óptico compacto para monitorización sustancialmente simultánea de muestras en un conjunto de muestras**

30 Prioridad:

15.03.2013 US 201313834056

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

15.12.2021

73 Titular/es:

**BIOFIRE DEFENSE, LLC (100.0%)
79 West 4500 South
Salt Lake City, UT 84107, US**

72 Inventor/es:

**ABBOTT, RICHARD DAVID;
RILEY, PATRICK L.;
EVANS, ZACKERY KENT y
NAY, LYLE M.**

74 Agente/Representante:

DURAN-CORRETJER, S.L.P

ES 2 885 680 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 compacto para monitorización sustancialmente simultánea de muestras en un conjunto de muestras

5 ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

El crecimiento de la investigación biológica ha tenido como resultado una serie de técnicas de ensayo, tales como ensayos con genes marcadores, cribado de nuevos compuestos farmacéuticos, reacción en cadena de la polimerasa ("PCR", polymerase chain reaction) de alto rendimiento, PCR en tiempo real y ensayos similares, y ha generado la necesidad de manejar grandes cantidades de muestras de prueba al mismo tiempo, para controlar costes y manejar eficientemente estas grandes cantidades de muestras. Actualmente están disponibles una serie de procedimientos analíticos para el cribado de alto rendimiento de estas muestras. Un procedimiento importante para monitorizar muestras en un entorno de alto rendimiento es la utilización de luminiscencia a partir de tintes fluorescentes y similares. Dichas sustancias pueden ser utilizadas como etiqueta, indicador o marcador para diversos ensayos de prueba en los que se puede utilizar luminiscencia como una medida directa o indirecta de una propiedad seleccionada en un pocillo de muestra.

En un ensayo de alto rendimiento o en tiempo real, habitualmente son procesadas y analizadas a la vez grandes cantidades de muestras (por ejemplo, mediante emisión de luminiscencia) en una placa de muestras de múltiples pocillos denominada una microplaca de ensayo. Estas microplacas proporcionan un conjunto de pocillos, usualmente 48 o 96 pocillos en ejemplos típicos, pero se están volviendo más comunes asimismo las microplacas de 384 pocillos y de 1536 pocillos. La configuración más común en este momento es el formato de 96 pocillos (en una configuración de 8 por 12). Ilustrativamente, todas las placas, independientemente del número de pocillos, pueden tener aproximadamente las mismas dimensiones. Es posible asimismo tener placas de otras configuraciones y dimensiones.

En muchos ensayos, los pocillos de microplacas de ensayo se llenan con muestras de prueba y a continuación se colocan en un instrumento que puede incluir un sistema detector, tal como un lector de microplacas por luminiscencia, para medir las emisiones relativas de luminiscencia de cada pocillo de prueba. Dado que los diferentes materiales de luminiscencia utilizados para ensayos de microplacas producen diferentes grados de intensidad de la luz, la intensidad de la luz puede actuar como una medida directa o indirecta de los resultados de la prueba -es decir, cuanto mayor es la intensidad de la luz, mayor es el resultado. Por ejemplo, algunos termocicladores PCR incluyen sistemas ópticos para monitorización en tiempo real de emisión de luminiscencia de muestras sometidas a termociclado para amplificación de ácidos nucleicos o para fusión post-amplificación. En dichos sistemas, la emisión fluorescente de uno o varios reactivos incluidos en la muestra o muestras se puede utilizar para monitorizar aspectos tales como la concentración de plantillas, la concentración de productos, la temperatura de puntos de fusión de ADN, y similares.

Aunque las microplacas de luminiscencia y los lectores de microplacas por luminiscencia e instrumentos similares son de gran utilidad en el cribado automatizado, hay un gran número de problemas que afectan a su utilización. En particular, salvo que un dispositivo óptico (por ejemplo, una cámara digital o analógica, u otro detector) se desplace lo suficientemente lejos de la microplaca, el dispositivo óptico no puede habitualmente ver simultáneamente el fondo de todos los pocillos. Esto se ilustra en la figura 1, que muestra una vista de una placa 100 de 96 pocillos desde una distancia relativamente próxima. Tal como se puede ver en la figura 1, una cámara u otro tipo de detector puede ver completamente hasta el fondo de los pocillos solamente en el centro de la placa, en la zona identificada como 110. Sin embargo, debido a la obstrucción por las paredes de los pocillos, la cámara no puede ver el fondo de los pocillos en la zona externa a la zona 110. Esto se muestra, por ejemplo, en los pocillos 120a y 120b. Se han desarrollado una serie de sistemas para permitir que lectores de microplacas e instrumentos similares vean en todos los pocillos de una microplaca.

En un ejemplo, el detector (por ejemplo, un dispositivo óptico, tal como una cámara digital) puede ser desplazado lo suficientemente lejos de la microplaca para permitir que el detector vea el fondo de todos los pocillos. Sin embargo, desplazar el dispositivo óptico lo suficientemente lejos de la microplaca aumenta el factor de forma del lector de placas y, típicamente, hace que el lector de placas sea grande e incómodo. Análogamente, aumentar arbitrariamente la distancia entre el dispositivo óptico y la microplaca provoca difusión de la luz y una pérdida de señal desde la microplaca, y puede asimismo producir diafonía entre señales procedentes de pocillos de muestras adyacentes.

En otro ejemplo, un lector de microplacas por luminiscencia puede tener una serie de dispositivos ópticos, donde cada dispositivo está posicionado para corresponder a un pocillo en la microplaca que contiene una muestra de prueba. A menudo, el dispositivo óptico es un fotodiodo.

En otro ejemplo más, el lector de microplacas por luminiscencia se puede montar con un único dispositivo óptico, donde la placa, el dispositivo de lectura o ambos son desplazados secuencialmente a la posición de lectura apropiada para detectar la luminiscencia en cada pocillo. El alineamiento puede verse afectado negativamente cuando uno o varios de los componentes alineados involucrados se desplace de su posición o resulta dañado. Si,

por cualquier razón, el alineamiento es incorrecto, los pocillos no se centrarán adecuadamente en alineamiento con el dispositivo de lectura óptica, con el resultado de una medición incorrecta de luminiscencia.

5 En otro ejemplo más, el lector de microplacas por luminiscencia se puede montar con un único dispositivo óptico y una o varias lentes ópticas que enfocan la señal procedente de los pocillos al dispositivo óptico. Sin embargo, dichos sistemas de lentes ópticas pueden ser costosos e incómodos. Además, la óptica utilizada para medir la luminiscencia tiene que evitar la diafonía procedente de un pocillo de muestra cuando se mide la luminiscencia de un pocillo adyacente. Se puede encontrar técnica anterior en las Patentes EP 1 750 115 A1 y DE 31 47 433 A1.

10 BREVE RESUMEN

Esta invención se refiere, en general, a aparatos y sistemas ópticos configurados para permitir la observación y monitorización sustancialmente simultáneas de una serie de puntos de interés en un conjunto, desde un punto de referencia común. Por ejemplo, una serie de puntos en un conjunto puede incluir los pocillos de muestra en una
15 placa de 96 pocillos. Según una realización de la presente invención, menos de la totalidad de la serie de puntos pueden ser observados de forma sustancialmente simultánea desde el punto de referencia común, sin aparatos y sistemas ópticos, tales como los dados a conocer en la presente memoria.

En una realización, se da a conocer un sistema óptico que define un camino óptico. El sistema óptico incluye un cuerpo incluido como un elemento en el camino óptico que incluye una serie de puntos de interés, y medios dispuestos en el camino óptico para permitir la observación de cada uno de la serie de puntos de interés de forma sustancialmente simultánea. Ejemplos adecuados de medios dispuestos en el camino óptico para permitir la observación de cada uno de la serie de puntos de interés de forma sustancialmente simultánea incluyen, de forma
20 no limitativa, un espejo con una curvatura compuesta, un bloque de muestras con un único eje de curvatura emparejado con un espejo con un único eje de curvatura que es complementario al bloque de muestras, y un bloque de muestras con una curvatura compuesta. Sin embargo, se debe observar que el medio dispuesto en el camino óptico es distinto de una lente de enfoque.

En un aspecto, el medio dispuesto en el camino óptico está posicionado y configurado de tal modo que el medio proporciona una vista sustancialmente sin obstáculos de cada uno de los puntos de interés de forma sustancialmente simultánea. En otro aspecto, el medio dispuesto en el camino óptico está configurado de tal modo que el medio define una longitud de rayo desde cada punto de interés hasta un punto de referencia común cuya distancia desde la serie de puntos de interés es menor o igual que una distancia predeterminada. En otro aspecto
25 más, cada una de las longitudes de rayo desde cada punto de interés hasta el punto de referencia común es sustancialmente igual en longitud, y estas tienen caminos que son sustancialmente paralelos entre sí durante, por lo menos, una parte del camino.

En otra realización, se da a conocer un aparato. El aparato puede incluir un sistema de termociclado configurado para someter a ciclado térmico una serie de muestras biológicas contenidas dentro de una correspondiente serie de
40 contenedores de muestras, y un sistema óptico que define un camino óptico que está asociado operativamente con el sistema de termociclado. El sistema óptico puede estar configurado y dispuesto para la monitorización sustancialmente simultánea de la fluorescencia en cada una de la serie de muestras biológicas.

En una realización, el sistema óptico puede incluir un bloque de muestras que es un elemento del camino óptico, incluyendo el bloque de muestras una superficie superior y una serie de pocillos de muestra que definen una serie de superficies inferiores rebajadas, y uno o varios elementos que definen colectivamente una o varias superficies curvas que están dispuestas en el camino óptico. Ejemplos adecuados de las una o varias superficies curvas incluyen, de forma no limitativa, un espejo con una curvatura compuesta, un bloque de muestras con un único eje de curvatura emparejado con un espejo con un único eje de curvatura que es complementario al bloque de muestras, y
50 un bloque de muestras con una curvatura compuesta. Las una o varias superficies curvas están configuradas de tal modo que definen colectivamente una longitud de rayo desde cada punto de interés hasta un punto de referencia común cuya distancia desde los puntos de interés es menor o igual que una distancia predeterminada. Las longitudes de rayo definidas por las una o varias superficies curvas pueden ser sustancialmente iguales.

En una realización, el bloque de muestras puede incluir una superficie superior y una serie de receptáculos de muestra que definen una serie de superficies inferiores rebajadas, donde la serie de superficies inferiores rebajadas definen una primera serie de puntos de interés. En otra realización, cada uno de la serie de receptáculos de muestra del bloque de muestras está configurado para interactuar con una serie de tubos de muestra o con una placa de pocillos de múltiples pocillos. Los tubos de muestra incluyen una superficie exterior y una superficie interior, y una
60 serie de superficies inferiores interiores rebajadas que definen una segunda serie de puntos de interés. Las una o varias superficies curvas pueden estar configuradas y dispuestas de tal modo que las longitudes de rayo desde la segunda serie de puntos de interés hasta el punto de referencia común pueden ser sustancialmente iguales.

En otra realización, la presente invención describe un aparato que incluye un sistema de termociclado configurado para someter una muestra a ciclado térmico y un sistema óptico asociado operativamente con el sistema de termociclado, estando configurado y dispuesto el sistema óptico para monitorizar la fluorescencia en la muestra. El

sistema óptico incluye una fuente de luz de iluminación (por ejemplo, una fuente de luz multicromática) y un filtro paso banda que puede transmitir, por lo menos, dos bandas diferentes de luz desde la fuente de luz de iluminación para excitar la fluorescencia de dos o más fluoróforos en la muestra, y una cámara posicionada para recoger la fluorescencia de los dos o más fluoróforos en la muestra.

Estos y otros objetivos y características de la presente invención resultarán más plenamente evidentes a partir de la siguiente descripción y las reivindicaciones adjuntas, o se pueden aprender mediante la práctica de la invención tal como se expone en lo que sigue.

10 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Para aclarar más lo anterior y otras ventajas y características de la presente invención tal como se define en las reivindicaciones, se presentará una descripción más particular de la invención haciendo referencia a realizaciones específicas de la misma, que se muestran en los dibujos adjuntos. Se aprecia que estos dibujos representan solamente realizaciones ilustradas de la invención y, por lo tanto, no se debe considerar que limitan su alcance. La invención se describirá y explicará con especificidad y detalle adicionales mediante la utilización de los dibujos adjuntos, en los que:

la figura 1 muestra una placa de 96 pocillos;
 20 la figura 2A muestra un sistema óptico que puede ser utilizado para observación sustancialmente simultánea de un conjunto de puntos de interés;
 la figura 2B muestra un único receptáculo de muestra del bloque de muestras de la figura 2A;
 la figura 2C muestra un único receptáculo de muestra del bloque de muestras de la figura 2A con un tubo de muestra introducido en el mismo;
 25 la figura 3A muestra una vista isométrica de un espejo con curvatura compuesta;
 la figura 3B muestra una vista, en alzado lateral, del espejo de la figura 3A;
 la figura 3C muestra otra vista, en alzado lateral, del espejo de la figura 3A;
 la figura 3D muestra un diagrama de trazos de rayos para el espejo y el bloque de muestras de la figura 3A;
 la figura 4A muestra una vista isométrica de otra realización de un espejo con una curvatura compuesta;
 30 la figura 4B muestra una vista, en alzado lateral, del espejo de la figura 4A;
 la figura 4C muestra otra vista, en alzado lateral, del espejo de la figura 4A;
 la figura 4D muestra un diagrama de trazos de rayos para el espejo de la figura 4A;
 la figura 5A muestra una vista isométrica de un bloque de muestras con una superficie curva compuesta que se puede utilizar en un sistema óptico para observación sustancialmente simultánea de un conjunto de puntos de
 35 interés;
 la figura 5B muestra una vista, en alzado lateral, del bloque de muestras de la figura 5A;
 la figura 5C muestra otra vista, en alzado lateral, del bloque de muestras de la figura 5A;
 la figura 6A muestra un sistema óptico para observación sustancialmente simultánea de un conjunto de puntos de interés, que incluye una vista isométrica de un bloque de muestras con un único eje de curvatura en relación con un
 40 espejo con un único eje de curvatura ortogonal;
 la figura 6B muestra una vista isométrica del bloque de muestras de la figura 6A;
 la figura 6C muestra una vista isométrica del espejo de la figura 6A;
 la figura 7 es un diagrama de bloques de una realización a modo de ejemplo de un sistema de ciclado térmico, según aspectos de la invención;
 45 la figura 8A muestra una vista isométrica de un sistema de ciclado térmico que incluye un sistema óptico que puede ser utilizado para observación sustancialmente simultánea de un conjunto de muestras que están sometidas a ciclado térmico; y
 la figura 8B muestra una vista recortada parcial del sistema de ciclado térmico de la figura 8A.

50 DESCRIPCIÓN DETALLADA

I. INTRODUCCIÓN Y DEFINICIONES

Esta invención se refiere, en general, a aparatos y sistemas ópticos configurados para permitir la observación y monitorización sustancialmente simultáneas de una serie de puntos de interés en un conjunto, desde un punto de referencia común. Por ejemplo, una serie de puntos en un conjunto puede incluir los pocillos de muestra en una placa de 96 pocillos. Según una realización de la presente invención, no toda la serie de puntos puede ser observada de forma sustancialmente simultánea desde el punto de referencia común sin los aparatos y sistemas ópticos dados a conocer en el presente documento.

En una realización, la presente invención puede estar dirigida a un sistema óptico que se utiliza para reunir datos de fluorescencia emitida, procedentes de muestras que son excitadas por una de múltiples posibles fuentes de excitación. Por ejemplo, los aparatos y sistemas ópticos descritos en la presente memoria se pueden utilizar para monitorización en tiempo real (por ejemplo, monitorización) de muestras biológicas sometidas a reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o a una técnica similar de amplificación de ácidos nucleicos. Los datos se capturan utilizando un sistema de adquisición basado en cámara, enfocado sobre muestras en una placa de muestras (por

ejemplo, una placa de muestras de 96 pocillos) que está emplazada a una distancia fija de la cámara (por ejemplo, en un bloque de muestras del termociclador PCR).

Aunque la presente invención explica en general la monitorización fluorescente de una reacción PCR, como un ejemplo en el que se pueden utilizar los aparatos y sistemas ópticos, esto no pretende ser limitativo. Los aparatos y sistemas ópticos descritos en la presente memoria pueden recoger datos de, o monitorizar esencialmente cualquier ensayo, prueba o similar detectado ópticamente, que se lleve a cabo en un formato de placa de múltiples pocillos, o dispuesto en otro formato plano de conjunto. Por ejemplo, los aparatos y sistemas ópticos descritos en la presente memoria se pueden utilizar para monitorizar ensayos tales como, de forma no limitativa, ensayos de indicadores con una lectura óptica (por ejemplo, ensayos fluorescentes), ensayos de fusión de proteínas, ensayos de fusión de ácidos nucleicos, ensayos de anticuerpos fluorescentes directos, ensayos turbidimétricos y similares.

Una limitación de la recogida de datos desde una placa de pocillos estándar se deriva de la geometría de la propia placa. Es decir, la placa de pocillos incluye una muestra relativamente pequeña en el fondo de un pocillo de muestra estrecho, relativamente alto. Para que una cámara (por ejemplo, una cámara digital o analógica) u otro dispositivo de formación de imágenes pueda formar una imagen del fondo de cada pocillo en una placa estándar de 96 pocillos de forma sustancialmente simultánea sin que la parte superior o las paredes de los pocillos periféricos eclipsen parcialmente la propia muestra, el sistema de formación de imágenes podría incluir ilustrativamente óptica adicional (por ejemplo, una o varias lentes ópticas que enfocan la señal de los pocillos sobre la cámara), o la cámara podría estar colocada aproximadamente entre 17 a 18 pulgadas o más sobre la parte superior de la placa. Tal como se ha explicado en la sección del Estado de la técnica anterior, los sistemas de lentes incrementan el coste y la complejidad de un instrumento, y desplazar la cámara suficientemente lejos del instrumento afecta negativamente al tamaño del instrumento. Para prescindir de óptica de enfoque complicada y costosa, reduciendo al mismo tiempo el factor de forma del instrumento, es deseable desarrollar procedimientos alternativos de adquisición de datos que tengan un perfil bajo sin que experimenten ninguna ocultación de las muestras.

Antes de dar a conocer y describir los aparatos y sistemas ópticos, se debe entender que esta invención no se limita a las configuraciones y materiales concretos dados a conocer en la presente memoria, dado que dichas configuraciones y materiales pueden variar en cierta medida. Se debe entender asimismo que la terminología empleada en la presente memoria se utiliza solamente con el propósito de describir realizaciones particulares, y no está destinada a ser limitativa, dado que el alcance de la presente invención estará limitado solamente por las reivindicaciones adjuntas y sus equivalentes.

Se debe observar que, tal como se utilizan en esta descripción y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un”, “una”, “el” y “la” incluyen referentes plurales, salvo que el contexto indique claramente lo contrario.

En la descripción y reivindicación de la presente invención, la siguiente terminología se utilizará en conformidad con las definiciones expuestas a continuación.

Tal como se utilizan en la presente memoria, los términos “reacción en cadena de la polimerasa” y “PCR” se refieren a una técnica utilizada en biología molecular para la amplificación de una plantilla de ácido nucleico. PCR obtiene su nombre de uno de sus componentes clave, una polimerasa de ADN utilizada para amplificar un elemento de ADN mediante replicación enzimática in vitro cíclica. Habitualmente, la PCR utiliza una polimerasa termoestable, desoxinucleótidos trifosfato (“dNTP”), un par de cebadores y un ADN plantilla. Una sola reacción (o ciclo) de PCR involucra a menudo (1) aumentar la temperatura de la muestra lo suficiente para deshacer o desnaturalizar una molécula de ADN bicatenaria en plantillas monocatenarias, (2) enfriar la muestra para permitir que un cebador de ADN se una a, o se hibride con cada plantilla y, opcionalmente, (3) reajustar la temperatura de la muestra para optimizar la adición enzimática de dNTP sobre un término de cada cebador unido, para formar una nueva molécula de ADN. A medida que la PCR progresa, el propio ADN generado (el “amplicón”) se utiliza como una plantilla para replicación adicional. Esto pone en marcha una reacción en cadena en la que la plantilla de ADN se amplifica exponencialmente. Con la PCR es posible amplificar en varios órdenes de magnitud una sola o unas pocas copias de ADN, generando millones de copias de ADN o más.

Aunque la PCR es el procedimiento de amplificación utilizado en los ejemplos de la presente memoria, se entiende que se contemplan otros procedimientos de amplificación, tales como amplificación por desplazamiento de cadena (SDA, strand displacement amplification), amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos (NASBA, nucleic acid sequence-based amplification), amplificación en círculo rodante en cascada (CRCA, cascade rolling circle amplification), amplificación de ADN isotérmica mediada por bucle (LAMP); amplificación isotérmica y quimérica de ácidos nucleicos iniciada por cebador (ICAN); amplificación dependiente de la helicasa (HDA, -helicase dependent amplification) basada en diana; amplificación mediada por transcripción (TMA, transcription-mediated amplification) y similares. Por lo tanto, cuando se utiliza el término PCR, se debe entender que incluye otros procedimientos alternativos de amplificación.

Tal como se utilizan en la presente memoria, los términos “ácido nucleico”, “ADN”, “ARN” y términos similares, incluyen asimismo análogos de ácidos nucleicos, es decir, análogos con uno diferente de un esqueleto de enlaces fosfodiéster. Por ejemplo, los denominados “ácidos nucleicos péptidos”, que se conocen en la técnica y tienen

enlaces péptidos en lugar de enlaces fosfodiéster en el esqueleto de enlaces, se consideran dentro del alcance de la presente invención.

5 Tal como se utilizan en la presente memoria, los términos "monitorización fluorescente", "monitorización continua" y términos similares se refieren a técnicas de monitorización para monitorizar una reacción PCR en tiempo real, ya sea por medio de fluorescencia intrínseca de ácidos nucleicos o por medio de tintes o sondas que pueden estar incluidos en una reacción PCR. Por ejemplo, la monitorización continua puede involucrar monitorizar propiedades de emisión de una reacción PCR múltiples veces durante un ciclo de PCR, durante transiciones o mantenimientos de temperatura, y más preferentemente obtener, por lo menos, un punto de datos en cada transición o mantenimiento de temperatura.

10 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término monitorización "ciclo a ciclo" significa monitorizar la reacción PCR una vez por ciclo, ilustrativamente durante la fase de hibridación de la PCR. Tal como se utilizan en la presente memoria, los términos "relación de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia", "FRET" (fluorescence resonance energy transfer relationship) y términos similares se refieren a transferencia de energía entre dos fluoróforos que están en estrecha proximidad física. Los fluoróforos pueden incluir un donante y un desactivador, tal como en sondas de tipo TaqMan, o pueden incluir un donante y un aceptor, donde el espectro de emisión de un fluoróforo se superpone con el espectro de excitación del otro. Una de dichas configuraciones involucra la hibridación adyacente de un oligonucleótido etiquetado con un fluoróforo donante y otro oligonucleótido etiquetado con un fluoróforo aceptor, en un ácido nucleico diana, de tal modo que el fluoróforo donante puede transferir energía de resonancia al fluoróforo aceptor de manera que el fluoróforo aceptor produce una emisión de fluorescencia medible.

15 Tal como se utilizan en el presente documento, "tintes específicos de ácido nucleico bicatenario" o "tintes de unión dsDNA" incluyen cualquier sustancia que pueda ser detectada con la presencia de un ácido nucleico bicatenario, preferentemente que forme un compuesto con el mismo. Típicamente, un tinte de unión dsDNA se unirá de manera preferente con, o formará un compuesto con un ácido nucleico bicatenario. Ilustrativamente, el tinte de unión dsDNA es un tinte fluorescente, y sus características fluorescentes cuando forma un compuesto con el ácido nucleico bicatenario son distinguibles de las mismas cuando no forma el compuesto. Típicamente, un tinte de unión dsDNA producirá una señal fluorescente (emisión fluorescente) más fuerte (mayor) cuando forme un compuesto con el ácido nucleico bicatenario que cuando no lo haga. Sin embargo, dichos tintes pueden producir una señal fluorescente más débil (menor) cuando están unidos a un ácido nucleico bicatenario, o pueden producir una señal fluorescente diferente, tal como una señal a una longitud de onda diferente. Cualquiera de estas señales diferenciadas es útil en la presente invención.

20 Los tintes útiles en los procedimientos dados a conocer en la presente memoria incluyen, de forma no limitativa, SYBR® Green I, SYBR® Gold, bromuro de etidio, naranja de acridina, bromuro de propidio, PicoGreen®, Hoechst 33258, Hoechst 33342, Hoechst 34580, YO-PRO®-1, YOYO®-1, LC640, LC705 y LCGreen®. No obstante, otros tintes de unión dsDNA son conocidos en la técnica y se incluyen en el alcance de esta invención.

25 En la técnica se conocen otros medios de detección fluorescente. Se entiende que los tintes de unión FRET y dsDNA pretenden ser solamente ilustrativos.

30 La PCR requiere hibridación de cebadores y desnaturalización de plantillas repetitiva. Estas transiciones de hibridación son dependientes de la temperatura. Los ciclos de temperatura de la PCR que dirigen la amplificación, alternativamente desnaturalizan el producto acumulado a alta temperatura e hibridan cebadores con el producto a una temperatura menor. Las temperaturas de transición de desnaturalización del producto e hibridación de cebadores dependen principalmente de la longitud y del contenido de GC. Si una sonda está diseñada para hibridación interna en el producto de la PCR, la temperatura de fusión de la sonda depende asimismo del contenido de GC, de la longitud y del grado de complementariedad con la diana. Las sondas de fluorescencia y los tintes de unión dsDNA compatibles con la PCR pueden monitorizar la hibridación durante la amplificación y se pueden utilizar en análisis de fusión post-PCR.

55 II. APARATOS Y SISTEMAS ÓPTICOS

Haciendo referencia a continuación a la figura 2A, se muestra un ejemplo de un sistema óptico 200 que puede ser utilizado para la observación sustancialmente simultánea de puntos de interés en un conjunto. El sistema óptico 200 incluye un cuerpo 210, un bloque 220 de muestras que tiene una serie de receptáculos rebajados 225 y un aparato de observación 240 (por ejemplo, una cámara). En la realización mostrada, un espejo 230 o un elemento reflectante similar está interpuesto entre el bloque 220 de muestras y el aparato de observación 240. En la realización mostrada, el espejo 230, el bloque 220 de muestras y los medios de observación 240 están posicionados cooperativamente entre sí, de tal modo que el aparato de observación 240 puede observar/monitorizar de forma sustancialmente simultánea los contenidos y/o el estado de cada uno de los receptáculos rebajados 225.

60 Haciendo referencia a continuación a la figura 2B, se muestra una vista recortada de un solo receptáculo de muestra rebajado 225a. El receptáculo de muestra 225a mostrado en la figura 2B es a modo de ejemplo de los receptáculos

de muestra 225 del bloque 220 de muestras. El receptáculo de muestra mostrado 225a se extiende desde una superficie superior 222 del bloque 220 de muestras hacia una superficie inferior 224 del bloque 220 de muestras. Según la presente descripción, cada uno de los fondos 227 de los receptáculos de muestra puede definir uno de una serie de puntos de interés a observar/monitorizar por el sistema óptico 200. La figura 2C muestra un tubo de muestra 250 o un recipiente similar, que está configurado para interactuar con el receptáculo de muestra. El tubo de muestra 250 incluye una superficie exterior 252, una superficie interior 254, un extremo superior 260 y un extremo inferior. Según la presente descripción, cada uno de los fondos 256 de los tubos de muestra 250 puede definir uno de una serie de puntos de interés a observar/monitorizar por el sistema óptico 200. Tal como se muestra en la figura 2C, el tubo de muestra 250 es un tubo de muestra individual que, ilustrativamente, puede estar dispuesto en un conjunto. Sin embargo, se entiende que el tubo de muestra 250 puede ser parte de un tubo en tiras o de otra configuración. En una realización, los receptáculos rebajados 225 del bloque 220 de muestras pueden estar configurados para recibir una placa de pocillos de múltiples pocillos (por ejemplo, una placa de 96 pocillos) similar a la mostrada en la figura 1. Sin embargo, el espejo 230 está posicionado con respecto al bloque 220 de muestras y al aparato de observación 240, de tal modo que el aparato de observación puede ver de forma sustancialmente simultánea en el fondo de cada uno de los receptáculos de muestra 225 o de los pocillos rebajados de una placa de pocillos.

En la realización mostrada, el aparato de observación 240 está posicionado a una distancia predeterminada 'd' desde el bloque 220 de muestras, con un camino que forma un ángulo en el espejo 230. En la realización mostrada, 'd' incluye un componente vertical y uno horizontal. En una realización, las longitudes combinadas de los componentes vertical y horizontal tienen aproximadamente 15 pulgadas. Por ejemplo, para algunos puntos, el componente vertical puede tener aproximadamente 4 pulgadas y el componente horizontal puede tener aproximadamente 11 pulgadas. En un aspecto, uno o varios del bloque 220 de muestras y el espejo 230 están configurados de tal modo que las longitudes de rayo desde una serie de puntos de interés (por ejemplo, el fondo de cada uno de los receptáculos de muestra 225) hasta el aparato de observación 240 son sustancialmente iguales. En la realización mostrada, las longitudes de rayo pueden tener una longitud que es sustancialmente igual a la distancia predeterminada.

En la realización mostrada de la figura 2A, el espejo 230 es un espejo de doble curvatura que está diseñado y posicionado especialmente para permitir que el aparato de observación 240 vea en el fondo de todos los receptáculos de muestra 225 o en el fondo de los pocillos de una placa de pocillos de múltiples pocillos, de forma sustancialmente simultánea. A la distancia 'd', el aparato de observación 240 no podría ver de forma sustancialmente simultánea en el fondo de todos los receptáculos de muestra 225 o en el fondo de todos los pocillos de una placa de pocillos de múltiples pocillos, sin el espejo 230 o un medio similar descrito en la presente memoria. La distancia "d" es más corta que la distancia entre el fondo de los receptáculos de muestra y el aparato de observación en un sistema similar en el que el aparato de observación esté posicionado en línea recta desde los receptáculos de muestra, sin la intervención de lentes ópticas.

En referencia a las figuras 3A a 4D se explicarán en mayor detalle espejos de doble curvatura, tal como el espejo 230. A continuación se describirán asimismo en mayor detalle otros componentes curvos que pueden estar incluidos en un sistema óptico, tal como el sistema óptico 200, y que están configurados para permitir que un aparato de observación 240 monitorice de forma sustancialmente simultánea una serie de puntos de interés. Por ejemplo, haciendo referencia a las figuras 5A a 5C, se explicará un bloque de muestras que tiene una superficie curva compuesta y, haciendo referencia a las figuras 6A a 6C, se explicará una combinación de un bloque de muestras con un solo eje de curvatura y un espejo con un solo eje de curvatura complementario.

Haciendo referencia a continuación a las figuras 3A a 3D, se muestran varias vistas de un espejo 300 que tiene una curvatura compuesta. La figura 3A muestra una vista isométrica del espejo 300; la figura 3B muestra una vista, en alzado lateral, de una primera cara 350 del espejo 300; y la figura 3C muestra una vista, en alzado lateral, de una segunda cara 360 del espejo 300. La figura 3D muestra un diagrama de trazos de rayos que muestra los caminos de la luz 370 desde una serie de puntos de interés 380 hasta un punto de visión común 390.

El espejo 300 incluye una superficie superior reflectante 310 y una superficie inferior 320. El espejo 300 se puede fabricar mediante cualquier técnica conocida en la materia. En un ejemplo, el espejo 300 puede ser moldeado por inyección a partir de plástico, y revestido a continuación en un proceso de revestimiento a baja temperatura para producir la superficie reflectante 310.

En la realización mostrada, la superficie superior 310 está curvada en dos ejes, que se identifican como 330 y 340. Los ejes 330 y 340 son ortogonales entre sí. Los dos ejes de curvatura 330 y 340 pueden asimismo verse en las figuras 3B y 3C, respectivamente. La figura 3B es una vista, en alzado lateral, de la cara 350, que muestra la cara 350 a lo largo del eje de curvatura 330. La figura 3C es una vista, en alzado lateral, de la cara 360, que muestra el eje de curvatura 340. En una realización, el espejo 300 está curvado como un espejo bicónico de doble curvatura. Curvar los espejos en dos planos permite la visualización de tiras y placas desechables estándar disponibles. Utilizando un bloque de muestras plano estándar, cada rayo axial es trazado verticalmente hacia arriba, rebota en el espejo y sale en ángulo directamente al centro de un aparato de observación (por ejemplo, una lente de cámara).

Esto se muestra esquemáticamente en la figura 3D. En la figura 3D, los rayos axiales 370 procedentes de una serie de puntos de interés 380 están dirigidos a un punto de referencia común en 390. La figura 3D muestra asimismo que cada uno de los rayos axiales 370 incluye un componente vertical (ver, por ejemplo, los rayos verticales 372 y 376) y un componente sustancialmente horizontal (ver, por ejemplo, los rayos sustancialmente horizontales 374 y 378).

5 Aunque los componentes verticales y los componentes sustancialmente horizontales de cada uno de los rayos axiales 370 pueden ser diferentes, la suma del componente vertical más el componente sustancialmente horizontal puede ser sustancialmente igual para cada uno de los rayos axiales 370. Por ejemplo, en la realización mostrada, la longitud total del rayo 372 más el rayo 374 es sustancialmente igual a la longitud total del rayo 376 más el rayo 378.

10 Cuando la longitud global de cada rayo 370 desde la serie de puntos de interés 380 hasta el punto de referencia común 390 se restringe a ser sustancialmente la misma longitud, la forma resultante 300 del espejo se puede describir como una forma bicónica de doble curvatura. Es decir, si el espejo 300 se cortara en una serie de secciones a lo largo de un eje vertical o de uno horizontal, cada sección sería una sección cónica. Sin embargo, las secciones cónicas formadas por rebanadas verticales y las secciones cónicas formadas por rebanadas horizontales ortogonales no son necesariamente iguales -es decir, la curvatura a lo largo del eje 340 no es necesariamente igual que la curvatura a lo largo del eje 330.

En una realización, la forma del espejo 300 se puede describir como siendo esférica con una denominada flecha esférica. Un espejo esférico se puede definir como un espejo cuyos perfiles de superficie no son parte de una esfera ni de un cilindro. Un espejo esférico es un elemento óptico simétrico rotacionalmente cuyo radio de curvatura varía radialmente desde su centro. Quizás la característica geométrica más singular de un espejo esférico es que el radio de curvatura cambia con la distancia desde el eje óptico, a diferencia de una esfera, que tiene un radio constante. En un ejemplo, el espejo 300 se puede definir con el perfil de superficie (flecha) proporcionado por la ecuación 1

25
$$Z = (s^2/r) / (1+(1-(k+1)(s/r)^2)^{1/2}) + \text{Desplazamiento} \quad \text{Ecuación 1}$$

donde Z = flecha de superficie paralela al eje óptico, k = constante cónica y $s^2 = (ax+b)^2 + (cy+d)^2$.

Ilustrativamente, los coeficientes son:

- 30
- k=-1
 - r = -1,1E+01

35

 - a = 1
 - b = -1,1E+01
 - c = 1

40

 - d= 0
 - Desplazamiento = 9,5

45 La siguiente tabla muestra cómo la superficie cónica real generada depende de la magnitud y del signo de la constante cónica k.

Tabla 1

Constante cónica	Superficie cónica
k = 0	Esfera
k > -1	Elipse
k = -1	Parábola
k < -1	Hipérbola

50 Por lo tanto, en la realización ilustrativa en la que la forma de espejo 300 está determinada por la ecuación 1 con los coeficientes proporcionados anteriormente, las curvaturas 330 y 340 trazan parábolas. No obstante, son posibles otras formas pero no están dentro del alcance reivindicado.

55 En un aspecto, restringir la forma del espejo 300 de tal modo que las longitudes de rayo desde un conjunto de puntos de interés hasta un punto de referencia común (por ejemplo, un punto de convergencia común) sean sustancialmente de la misma longitud tiene el efecto de permitir que un aparato de observación vea completamente hasta el fondo de cada uno de los receptáculos de muestra cuando, por ejemplo, el espejo 300 está incorporado a un sistema óptico, tal como se muestra en la figura 2. Las imágenes recogidas utilizando el espejo 300 conformado,

por ejemplo, según la ecuación 1, pueden estar algo distorsionadas (por ejemplo, en un patrón de abanico), pero no hay interferencia ni ocultación mediante la parte superior de los pocillos de muestra. Ver, por ejemplo, la figura 1 para un ejemplo de interferencia u ocultación mediante la parte superior de los pocillos de muestra. Además, la distorsión utilizando el espejo 300 acorde con la ecuación 1 será sustancialmente la misma de una imagen a otra, lo que permite que la distorsión sea corregida o equilibrada en procesamiento de datos.

Se entiende que son posibles otras formas de espejo, aunque no están dentro del alcance reivindicado, siempre que la forma proporcione una imagen del fondo de cada recipiente de muestras. Por ejemplo, un espejo esférico adecuadamente conformado y posicionado puede ser capaz de formar imágenes de todos los pocillos de muestra en un conjunto de muestras, sin ocultación. Sin embargo, con un espejo de este tipo, puede ser el caso que las longitudes de rayo desde los puntos de interés hasta un punto de referencia común no sean necesariamente de la misma longitud.

Haciendo referencia a continuación a las figuras 4A a 4D, una realización alternativa de un espejo de doble curvatura 400. El espejo 400 es similar al espejo 300 en muchos aspectos, excepto que el espejo 400 tiene mayores grados de curvatura. El espejo 400 incluye una parte superior, una superficie reflectante 410 y una superficie inferior 420. La superficie superior 410 está curvada en dos ejes, que están identificados como 430 y 440. Los ejes 430 y 440 son ortogonales entre sí. Los dos ejes 430 y 440 de curvatura pueden verse asimismo en las figuras 4B y 4C. La figura 4B es una vista, en alzado lateral, de la cara 450, que muestra la cara 450 a lo largo del eje 430 de curvatura. La figura 4C es una vista, en alzado lateral, de la cara 460, que muestra el eje 440 de curvatura.

El efecto de curvatura del espejo con radios de curvatura menores con respecto al espejo 300 se muestra esquemáticamente en la figura 4D. En la figura 4D, los rayos axiales 470 procedentes de una serie de puntos de interés 480 están dirigidos a un punto de referencia común en 490. La figura 4D muestra asimismo que cada uno de los rayos axiales 470 incluye un componente vertical (ver, por ejemplo, los rayos verticales 472 y 476) y un componente sustancialmente horizontal (ver, por ejemplo, los rayos sustancialmente horizontales 474 y 478). Aunque los componentes verticales y los componentes sustancialmente horizontales de cada uno de los rayos axiales 470 pueden ser diferentes, la suma del componente vertical más el componente sustancialmente horizontal puede ser sustancialmente igual para cada uno de los rayos axiales 470. Por ejemplo, en la realización mostrada, la longitud total del rayo 472 más el rayo 474 es sustancialmente igual a la longitud total del rayo 476 más el rayo 478.

Cuando la longitud global de cada rayo 470 desde la serie de puntos de interés 480 hasta el punto de referencia común 490 está restringida a ser sustancialmente la misma longitud, la forma resultante 400 del espejo es un espejo bicónico de doble curvatura. Esto tiene el efecto de permitir que un aparato de observación vea completamente hasta el fondo de cada uno de los receptáculos de muestra cuando, por ejemplo, el espejo 400 está incorporado en un sistema óptico, tal como el mostrado en la figura 2, sin la necesidad de una o varias lentes de enfoque o de uno o varios espejos. Las imágenes recogidas utilizando el espejo 400 están distorsionadas en un patrón de abanico, pero no existe interferencia ni ocultación mediante la parte superior de los pocillos de muestra (ver, por ejemplo, la figura 1 para un ejemplo de ocultación).

Haciendo referencia a continuación a las figuras 5A a 5C, se muestran varias vistas de un bloque de muestras 500 que tiene una curvatura compuesta. La figura 5A muestra una vista isométrica del bloque de muestras 500; la figura 5B muestra una vista, en alzado lateral, de una primera cara 550 del bloque de muestras 500; y la figura 5C muestra una vista, en alzado lateral, de una segunda cara 560 del bloque de muestras 500. En algunas realizaciones, el bloque de muestras 500 se puede utilizar en un sistema óptico, como alternativa a los espejos de doble curvatura mostrados en las figuras 3A a 3D o 4A a 4D.

El bloque de muestras 500 incluye una superficie superior 510, una superficie inferior 520 y una serie de (por ejemplo, 96) receptáculos de muestra 525. Los receptáculos de muestra 525 pueden estar configurados para recibir directamente muestras líquidas, o los receptáculos de muestra 525 pueden estar configurados para recibir tubos de muestras independientes o una placa de muestras.

En una realización, el bloque de muestras 500 puede estar fabricado de un material seleccionado a partir de metales tales como aluminio, cobre y plata, cerámicas, plástico y similares. En una realización, el bloque de muestras 500 está incluido un aparato de bloque térmico en un instrumento PCR. En tal caso, el bloque de muestras puede estar fabricado preferentemente de un material de alta conductividad térmica tal como, de forma no limitativa, aluminio, cobre o plata.

En la realización mostrada, la superficie superior 510 incluye dos ejes de curvatura, que están identificados como 530 y 540. Los ejes 530 y 540 son ortogonales entre sí y pueden tener radios iguales o diferentes. Los dos ejes 530 y 540 de curvatura pueden asimismo verse en las figuras 5B y 5C. La figura 5B es una vista, en alzado lateral, de la cara 550, que muestra el eje 530 de curvatura. La figura 5C es una vista, en alzado lateral, de la cara 560, que muestra el eje 540 de curvatura. En una realización, las curvaturas 530 y 540 tienen los mismos radios, y el bloque de muestras 500 está curvado como una sección de una esfera. En una realización, la esfera tiene un radio igual, o casi igual a la distancia desde la superficie superior hasta un aparato de observación. Por

ejemplo, si el aparato de observación es una cámara, entonces el radio de la esfera que define la forma del bloque de muestras 500 puede ser igual a la distancia desde la superficie superior 510 del bloque de muestras 500 hasta la parte frontal de una lente de cámara.

5 En la realización mostrada en las figuras 5A a 5C, un aparato de observación similar al que se muestra en la figura 2A puede ver el fondo 527 de cada uno de los receptáculos de muestra 525, debido a que los receptáculos de muestra 525 están dispuestos de tal modo que son normales a la curvatura de la superficie superior 510 del bloque de muestras. Esto tiene el efecto de inclinar ligeramente cada receptáculo de muestra 525, de tal modo que el fondo 527 de cada receptáculo de muestra apunta directamente hacia un aparato de observación, para superar el paralaje de la luz (ver, por ejemplo, la figura 1). Esto tiene el efecto de permitir que un aparato de observación vea completamente hasta el fondo 527 de cada uno de los receptáculos de muestra 525, sin la necesidad de una o varias lentes de enfoque o de uno o varios espejos. Un bloque de muestras 500 de doble curvatura permitirá, por lo tanto, que el aparato de observación (por ejemplo, una cámara) forme una imagen directamente del fondo 527 de cada receptáculo de muestra 525 sin ninguna pérdida de señal debida a ocultación.

15 Haciendo referencia a continuación a las figuras 6A a 6C, se muestra una realización de un sistema óptico 600. El sistema óptico incluye un bloque de muestras 610 de curvatura simple y un espejo de curvatura simple complementario 650. Igual que con el bloque de muestras de doble curvatura, el sistema óptico 600 se puede utilizar como una alternativa a los espejos curvos descritos en las figuras 3A a 3D y 4A a 4D para una observación sustancialmente simultánea de un conjunto de puntos de interés.

20 El bloque de muestras 610 incluye una superficie superior 620, una superficie inferior 630 y una serie de receptáculos de muestra 625. Los receptáculos de muestra 625 se extienden desde la superficie superior 620 hacia la superficie inferior 630. Los receptáculos de muestra 625 están dispuestos de tal modo que son normales a la curvatura de la superficie superior 620 del bloque de muestras 610. El bloque de muestras 610 de curvatura simple se asemeja a un bloque de muestras plano estándar que ha sido enrollado ligeramente con el mismo radio que la distancia al centro de un punto de observación común. Esto tiene el efecto de inclinar cada receptáculo de muestra 625 ligeramente a lo largo de la curvatura 640, de tal modo que el fondo 627 de cada receptáculo de muestra apunta directamente hacia un aparato de observación para superar el paralaje de la luz en un plano. En el plano liso, seguirá existiendo alguna interferencia en las muestras periféricas debido al borde superior del pocillo.

25 Sin embargo, cuando el bloque de muestras 610 de curvatura simple con curvatura 640 está emparejado con un espejo 650 de curvatura 670, que es ilustrativamente parabólico, colocado sobre el bloque de muestras 610 de curvatura simple, la combinación permite que una cámara o un dispositivo similar vea directamente el fondo 627 de cada receptáculo de muestra 625 del bloque de muestras 610 (o el fondo de una placa de pocillos colocada en el bloque de muestras 610). Un plano de corrección se consigue mediante la curva del bloque de muestras 610, y el otro se consigue mediante el espejo 650.

40 II. SISTEMAS DE TERMOCICLADO

A continuación se hará referencia a realizaciones a modo de ejemplo de sistemas de termociclado que están configurados para someter a ciclado térmico una serie de muestras biológicas contenidas dentro de una correspondiente serie de contenedores de muestras. Los sistemas de termociclado incluyen un sistema óptico que puede monitorizar de forma sustancialmente simultánea la fluorescencia en cada una de una serie de muestras biológicas. No obstante, estas realizaciones a modo de ejemplo no pretenden limitar la invención. Por el contrario, la invención está destinada a cubrir alternativas, modificaciones y equivalentes.

45 Haciendo referencia a la figura 7, se muestra un diagrama de bloques de un aparato 700 que incluye sistemas de control 702, un sistema de termociclado 708 y un sistema óptico 710, de acuerdo con aspectos a modo de ejemplo de la invención. El sistema óptico 710 define un camino óptico que está asociado operativamente con el sistema de termociclado 708. En una realización, el sistema óptico 710 incluye un bloque de muestras (por ejemplo, el bloque de muestras 716). El bloque de muestras incluye una superficie superior y una serie de pocillos de muestra que definen una serie de superficies inferiores rebajadas que pueden definir una primera serie de puntos de interés. Las muestras pueden estar colocadas directamente en el bloque de muestras o pueden estar colocadas en tubos de muestra que están configurados para interactuar con el bloque de muestras.

50 El sistema óptico 710 incluye, además, uno o varios elementos que definen colectivamente una o varias superficies curvas que están dispuestas en el camino óptico, donde las una o varias superficies curvas definen colectivamente una longitud de rayo desde cada punto de interés hasta un punto de referencia común cuya distancia desde los puntos de interés es menor o igual que una distancia predeterminada, y donde las longitudes de rayo son sustancialmente iguales y los rayos pueden ser sustancialmente paralelos entre sí durante, por lo menos, una parte de su camino. Tal como se ha explicado en mayor detalle en otro lugar de la presente memoria, las una o varias superficies curvas que están dispuestas en el camino óptico pueden incluir un espejo de doble curvatura, un bloque de muestras de doble curvatura o una combinación de bloque de muestras de curvatura simple y un espejo de curvatura simple complementario.

En una realización, el sistema óptico puede incluir, además, una cámara y una fuente de luz de iluminación que están, cada una, en una posición fija en el camino óptico con respecto al bloque de muestras y las una o varias superficies curvas. El bloque de muestras, la fuente de luz de iluminación y las una o varias superficies curvas están posicionadas y dispuestas entre sí de tal modo que la primera serie de puntos de interés puede ser iluminada de forma sustancialmente simultánea mediante la fuente de luz de iluminación y observada de forma sustancialmente simultánea desde un punto de referencia común por la cámara.

También haciendo referencia a la figura 7, unas muestras 714, que incluyen, de forma ilustrativa, ácidos nucleicos a amplificar, están colocadas en un bloque de muestras de temperatura controlada 716 y están cubiertas por una tapa calentada 712. Alternativamente, las muestras 714 pueden estar cubiertas por un recubrimiento de aceite, que puede impedir la evaporación de las muestras y puede sustituir la tapa calentada 712. Las muestras 708 pueden estar soportadas en un portamuestras (por ejemplo, en una placa de pocillos de múltiples pocillos, tiras de tubos o tubos de muestra individuales, etc.) configurado para estar emplazado en el bloque de muestras 716, y pueden estar térmicamente aisladas del aire ambiental mediante la tapa calentada 712 o un aceite de recubrimiento. El bloque de muestras 716 puede ser un bloque metálico fabricado, por ejemplo, de un metal térmicamente conductor, tal como cobre o aluminio. Tal como se explica en otro lugar del presente documento, el bloque de muestras 716 puede tener una serie de configuraciones planas o curvas.

Un usuario puede suministrar datos que definen parámetros de tiempo y temperatura (por ejemplo, perfiles de tiempo-temperatura) del protocolo PCR deseado, por medio de un terminal 704. Por ejemplo, el terminal 704 puede incluir un dispositivo informático externo que incluye un teclado, una pantalla y uno o varios módulos de control, de memoria o de programación, que permiten programar y controlar parámetros de termociclado, o puede ser integral al aparato. El terminal de usuario 704 está acoplado, por medio de un bus de datos 705, a un controlador 706 (en ocasiones, denominado una unidad central de procesamiento o CPU). El controlador 706 puede incluir memoria que almacena un programa de control deseado, datos que definen un protocolo PCR deseado, y determinadas constantes de calibración. Basándose en el programa de control, el controlador 706 puede controlar el ciclo de temperatura del bloque de muestras 716 y/o soportes que contienen las muestras 714, e implementa una interfaz de usuario que proporciona determinadas visualizaciones al usuario y recibe datos introducidos por el usuario a través del terminal de usuario 704. Análogamente, el controlador 706 puede incluir memoria que almacena un programa deseado para controlar o gestionar la recogida de datos de fluorescencia desde la muestra por medio del sistema óptico 710. Basándose en el programa de control, el controlador 706 puede controlar parámetros del sistema óptico, tales como la temporización de recogida de datos ópticos, datos de longitudes de onda y similares, e implementar una interfaz de usuario que proporciona determinadas visualizaciones al usuario y recibe datos introducidos por el usuario a través del terminal de usuario 704. Se apreciará que el controlador 706 y la electrónica periférica asociada para controlar los diversos calentadores, sistemas ópticos 710 y otros sistemas electromecánicos del sistema de ciclado térmico 708 y leer diversos sensores, pueden incluir cualquier ordenador de propósito general tal como, por ejemplo, un microordenador o un ordenador personal programado adecuadamente.

El controlador 706 puede incluir electrónica apropiada para detectar la temperatura de la tapa calentada 712 y controlar calentadores de resistencia eléctrica de la misma para mantener la tapa 712 a una temperatura predeterminada. La detección de la temperatura de la tapa calentada 712 y el control de los calentadores de resistencia en la misma se consigue por medio de un sensor de temperatura (no mostrado) y de un bus de datos 724.

Un sistema de enfriamiento 720 puede proporcionar un control preciso de temperatura de las muestras 714. Según algunos aspectos, el sistema de enfriamiento 720 se puede manejar para conseguir un control rápido, eficiente y/o uniforme de la temperatura de las muestras 714. Según algunos aspectos, el sistema de enfriamiento 720 se puede hacer funcionar para conseguir de manera rápida y/o eficiente un gradiente de temperatura deseado entre varias muestras. El sistema de enfriamiento 720 puede estar configurado, por ejemplo, para reducir la temperatura de las muestras 714 desde una incubación con desnaturalización a alta temperatura hasta una hibridación a menor temperatura y temperaturas de incubación de extensión. Por ejemplo, el sistema de enfriamiento 720 puede reducir la temperatura del bloque de muestras 716 o puede actuar para reducir directamente la temperatura de los soportes que contienen las muestras 714.

Un sistema de calentamiento 718 puede estar controlado por el controlador 706 por medio de un bus de datos 730 para aumentar rápidamente la temperatura del bloque de muestras 716 y/o de los portamuestras, a temperaturas de incubación mayores desde temperaturas de incubación menores. El sistema de calentamiento 718 puede asimismo corregir errores de temperatura en sentido ascendente durante el seguimiento y control de la temperatura durante incubaciones.

El sistema de calentamiento 718 puede incluir, de forma no limitativa, calentadores de película, calentadores resistivos, aire caliente, calentamiento por infrarrojos, calentamiento convectivo, calentamiento inductivo (por ejemplo, cable enrollado), calentamiento termoeléctrico basado en efecto Peltier, y otros mecanismos de calentamiento conocidos por los expertos en la materia. Según varias realizaciones a modo de ejemplo, el sistema de enfriamiento y el sistema de calentamiento pueden ser un solo sistema configurado tanto para aumentar como para reducir la temperatura del bloque 712 y/o de los portamuestras directamente.

En la realización a modo de ejemplo de la figura 7, el controlador 706 controla la temperatura del bloque de muestras 716 detectando la temperatura del bloque de muestras 716 por medio de un sensor de temperatura 728 y del bus de datos 726, y detectando la temperatura del sistema de enfriamiento 720 por medio del bus 732 y de un sensor de temperatura 734 en el sistema de enfriamiento 720. Solamente a modo de ejemplo, se puede detectar la temperatura del sistema de enfriamiento 720, aunque se pueden detectar asimismo otras temperaturas asociadas con el sistema de enfriamiento.

Se puede encontrar una discusión más amplia de sistemas de termociclado que se pueden utilizar en dispositivos y aparatos dados a conocer en la presente memoria, en la Patente PCT/US2011/063005 (publicada como WO 2012/075360), que se incorpora en su integridad como referencia el presente documento. Se puede encontrar una discusión de monitorización fluorescente de muestras y, en particular, de muestras PCR, en la Patente US 7,670,832, que se incorpora en su integridad como referencia al presente documento.

Haciendo referencia a continuación a las figuras 8A y 8B, se muestra una realización específica de un instrumento PCR 800 que incluye un sistema óptico. El instrumento PCR 800 incluye un cuerpo envolvente 801 que puede incluir sistemas de control 802 y componentes de un sistema de termociclado 804 (por ejemplo, sistemas de calentamiento y sistemas de enfriamiento). El cuerpo envolvente 801 puede incluir asimismo una tapa superior sustancialmente opaca (no mostrada) que está configurada para encajar en el cuerpo envolvente 801. El instrumento PCR 800 puede incluir asimismo un dispositivo informático interno o externo (no mostrado) que está acoplado operativamente a, por lo menos, uno de los sistemas de control 802 o al sistema de termociclado 804. Análogamente, el dispositivo informático externo puede estar conectado al sistema óptico.

El sistema óptico del instrumento PCR 800 incluye un bloque de muestras sustancialmente plano 806, un espejo 808, una cámara 810 y una fuente de luz de iluminación 816. En la realización mostrada, el espejo 808 es similar al espejo 300 de doble curvatura mostrado en las figuras 3A a 3D. No obstante, se apreciará que el sistema óptico puede incluir, por ejemplo, el bloque de muestras 500 de doble curvatura mostrado en las figuras 5A a 5D, o la combinación del bloque de muestras 610 de curvatura simple y el espejo 650 de curvatura simple mostrados en las figuras 6A a 6C.

Haciendo referencia a la figura 8B, el bloque 806 de muestras incluye una serie de receptáculos 824 de muestra que están configurados para recibir una serie de tubos de muestra o una placa de 96 pocillos (no mostrada). El instrumento PCR 800 puede incluir una tapa calentada (no mostrada) que está posicionada y configurada para ajustar sobre el bloque 806 de muestras y los tubos de muestra posicionados en el mismo. El espejo 808 incluye una superficie reflectante 822.

Tal como se explica en mayor detalle en otro lugar de la presente memoria, la superficie reflectante 822 del espejo 808 está curvada y posicionada con respecto al bloque 806 de muestras para dirigir luz desde la fuente de luz de iluminación 816 a cada uno de los tubos de muestra en los receptáculos 824 de muestra y para dirigir de forma sustancialmente simultánea una señal fluorescente resultante, desde cada uno de los tubos de muestra a la cámara 810.

En la realización mostrada, la fuente de luz de iluminación 816 incluye, además, filtros 818 y 820 que se pueden utilizar para seleccionar diversas longitudes de onda de excitación para la excitación de fluorescencia desde diversos tintes. Por ejemplo, los filtros 818 y 820 se pueden utilizar para seleccionar longitudes de onda de excitación seleccionadas entre, pero sin limitarse a, 470, 530, 586 y 630 nm. Análogamente, la cámara 810 puede estar equipada con una rueda de filtros 812, y filtros 814, que se pueden utilizar para filtrar diversas señales fluorescentes, ilustrativamente a 510, 555, 620, 640, 665 y 710 nm. Por ejemplo, un experimento puede incluir la utilización de múltiples tintes que presentan fluorescencia simultáneamente. Los filtros 812 y 814 se pueden utilizar, por ejemplo, para distinguir entre sí dos o más fluoróforos que están emitiendo simultáneamente en la muestra o muestras.

En un ejemplo, la fuente de luz de iluminación 816 puede incluir una fuente de luz multicromática y los filtros 818 y 820 pueden ser denominados filtros de banda dual. Por ejemplo, la fuente de luz de iluminación 816 puede incluir una o varias lámparas que están, cada una, equipadas con varios LED (u otras fuentes de luz conocidas) que tienen, por lo menos, dos colores de emisión diferentes, y óptica de enfoque que puede enfocar y difundir luz desde los LED, de manera que estos pueden proporcionar una salida que es, ilustrativamente, sustancialmente gaussiana. Los filtros de banda dual 818 y 820 pueden, cada uno, estar equipados de tal forma que pueden pasar una banda de emisión desde los diferentes LED. Por ejemplo, el filtro 818 puede ser capaz de pasar bandas de luz centradas en torno a 470 y 586 nm y el filtro 820 puede ser capaz de pasar bandas de luz entradas en torno a 530 y 630 nm. Utilizando una fuente de luz de iluminación 816 y filtros 818 y 820 de este tipo, el sistema 800 puede estar configurado para producir hasta cuatro diferentes longitudes de onda de excitación a partir de solamente dos lámparas, permitiendo de ese modo la excitación de múltiples fluoróforos cada vez, ilustrativamente cuatro fluoróforos. En otras realizaciones, los filtros 818 y 820 pueden ser, por ejemplo, filtros paso banda triples y la fuente de luz de iluminación 816 puede incluir, por ejemplo, dos lámparas, cada una de las cuales puede producir tres intervalos discretos de color de luz. Un sistema de este tipo puede estar configurado para producir hasta seis

5 diferentes longitudes de onda de excitación a partir de solamente dos lámparas. Aunque la fuente de luz 816, los filtros 818 y 820, la cámara 810, la rueda de filtros 812 y los filtros 814 se muestran en el contexto del sistema PCR 800, se apreciará que dicha fuente de luz, cámara y sistema de filtro óptico se pueden utilizar esencialmente en cualquier sistema PCR que esté configurado para monitorización en tiempo real de muestras, independientemente de la presencia y/o la configuración de un espejo o de otros componentes descritos en la presente memoria.

10 En la realización mostrada, el sistema PCR 800 está diseñado de tal modo que el espejo 808, el bloque 806 de muestras y la cámara 810 están aproximadamente en ángulos rectos entre sí, pero esto no es un requisito. Son posibles otros ángulos.

Las realizaciones descritas se deben considerar, en todos los aspectos, solamente como ilustrativas y no restrictivas. Por lo tanto, el alcance de la invención se indica mediante las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Aparato, que comprende:

5 un sistema de termociclado (200) configurado para someter una serie de muestras biológicas contenidas dentro de una correspondiente serie de contenedores (220) de muestras a ciclado térmico; y un sistema óptico (300, 400) que define un camino óptico que está asociado operativamente con el sistema de termociclado, estando el sistema óptico configurado y dispuesto para la monitorización sustancialmente simultánea de fluorescencia en cada una de la serie de muestras biológicas, incluyendo el sistema óptico:
 10 un bloque (100, 220) de muestras que comprende un elemento del camino óptico, en el que el bloque de muestras incluye una superficie superior (222) y una serie de pocillos de muestra (225a) que definen una serie de superficies inferiores rebajadas (227), y **caracterizado por** un espejo curvo compuesto (300) posicionado y dispuesto en el camino óptico con respecto al bloque de muestras para permitir la observación simultánea de la totalidad de las superficies inferiores rebajadas de la totalidad de la serie de pocillos de muestra desde un punto de referencia común (390), sin interferencia u ocultación mediante la serie de pocillos de muestra, en el que el espejo curvo compuesto comprende una parte de una superficie de un paraboloide seleccionado para definir una primera curvatura y una segunda curvatura con ejes sustancialmente ortogonales y para definir una longitud de rayo desde las superficies inferiores rebajadas de la totalidad de la serie de pocillos de muestra hasta el punto de referencia común, donde las longitudes de rayo son sustancialmente iguales, y donde la primera curvatura es diferente de la segunda curvatura.

2. Aparato, según la reivindicación 1, en el que el bloque de muestras es un componente del sistema de termociclado.

25 3. Aparato, según la reivindicación 2, en el que el sistema de termociclado comprende, además:

un sistema de calentamiento y enfriamiento acoplado operativamente al bloque de muestras y que está configurado para el ciclado térmico de la serie de muestras biológicas;
 un sistema de control para hacer funcionar el sistema de calentamiento y enfriamiento, y conectado operativamente al mismo; y
 un sistema de detección de la temperatura, configurado para detectar la temperatura en el bloque de muestras, estando conectado operativamente el sistema de detección de la temperatura al sistema de calentamiento y enfriamiento y al sistema de control, de tal modo que la temperatura de la serie de muestras biológicas se puede aumentar y reducir de manera controlable mediante el sistema de calentamiento y enfriamiento en respuesta a una temperatura detectada por el sistema de detección de la temperatura, de tal modo que la serie de muestras biológicas pueden ser sometidas a ciclado térmico, en el que la respuesta térmica del sistema de detección de la temperatura se corresponde sustancialmente con la respuesta térmica de la serie de muestras biológicas contenidas en la serie de contenedores de muestras.

40 4. Aparato, según la reivindicación 3, en el que el sistema de control incluye un dispositivo informático que está acoplado operativamente a, por lo menos, uno del sistema de termociclado, el sistema óptico, el sistema de calentamiento y enfriamiento, el sistema de control o el sistema de detección de la temperatura.

45 5. Aparato, según la reivindicación 1, en el que cada uno de la serie de rebajes está configurado para interactuar con la serie de contenedores de muestras, incluyendo los contenedores de muestras una superficie exterior y una superficie interior, y una serie de superficies inferiores rebajadas, y en el que las una o varias superficies curvas están configuradas y dispuestas de tal modo que las longitudes de rayo desde las superficies inferiores rebajadas de la serie de contenedores de muestras hasta el punto de referencia común son sustancialmente iguales.

50 6. Aparato, según la reivindicación 1, en el que un perfil de superficie del espejo curvo compuesto está descrito por la ecuación 1

$$Z = (s^2/r) / (1+(1-(k+1)(s/r)^2)^{1/2}) + \text{Desplazamiento} \quad \text{Ecuación 1}$$

55 donde Z = flecha de superficie paralela al eje óptico, k = constante cónica y $s^2 = (ax+b)^2 + (cy+d)^2$, donde a, b, c y d son constantes.

7. Aparato, según la reivindicación 6, en el que, en la ecuación 1:

60 k = -1
 r = -1,1E+01
 a = 1
 b = -1,1E+01
 c = 1
 65 d = 0

Desplazamiento = 9,5.

5 8. Aparato, según la reivindicación 1, en el que la serie de contenedores de muestras comprende una placa de múltiples pocillos configurada para llevar a cabo una reacción PCR, y en el que la placa de múltiples pocillos tiene, por lo menos, 96 pocillos de muestra.

10 9. Aparato, según la reivindicación 1, en el que el camino óptico comprende, además, una cámara y una fuente de luz de iluminación, en el que, por lo menos, la cámara está posicionada sustancialmente en el punto de referencia común.

15 10. Aparato, según la reivindicación 9, en el que la cámara y la fuente de luz de iluminación están, cada una, en una posición fija en el camino óptico con respecto al bloque de muestras y las una o varias superficies curvas, estando posicionados y dispuestos entre sí el bloque de muestras, la fuente de luz de iluminación y las una o varias superficies curvas de tal modo que la primera serie de puntos de interés puede ser iluminada de forma sustancialmente simultánea mediante la fuente de luz de iluminación y observada de forma sustancialmente simultánea desde el punto de referencia común por la cámara.

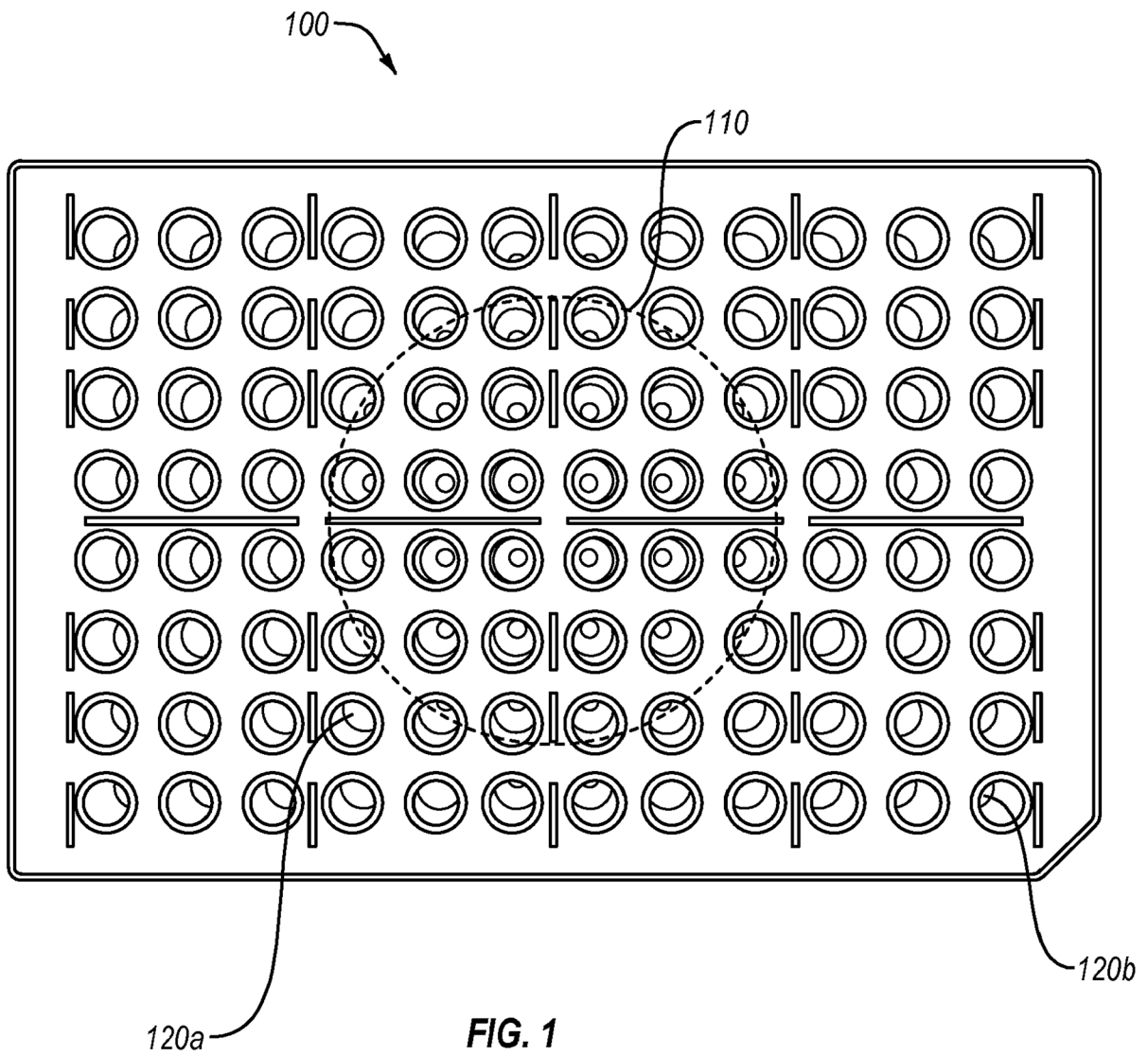
20 11. Aparato, según la reivindicación 9, en el que: la fuente de luz de iluminación incluye un filtro paso banda que puede transmitir, por lo menos, dos bandas diferentes de luz desde la fuente de luz de iluminación para excitar la fluorescencia de dos o más fluoróforos en la muestra, y la cámara está posicionada para recoger fluorescencia de los dos o más fluoróforos en la muestra.

25 12. Aparato, según la reivindicación 11, en el que la cámara está equipada con uno o varios filtros configurados para separar señales procedentes de dos o más fluoróforos que emiten de forma sustancialmente simultánea en la muestra, preferentemente, en el que el filtro paso banda de la fuente de luz de iluminación puede transmitir dos o más bandas de luz centradas en torno a 470 nm, 530 nm, 586 nm o 630 nm, y los uno o varios filtros de la cámara son, cada uno, capaces de transmitir una banda de luz centrada en torno a 510 nm, 555 nm, 620 nm, 640 nm, 665 nm o 710 nm.

30 13. Aparato, según la reivindicación 12, en el que el sistema óptico incluye dos fuentes de luz de iluminación y un correspondiente número de filtros paso banda, de tal modo que el sistema óptico puede transmitir de forma sustancialmente simultánea, por lo menos, cuatro diferentes longitudes de onda de luz desde las dos fuentes de luz de iluminación, preferentemente en el que los filtros paso banda son filtros paso banda de banda dual.

35 14. Aparato, según la reivindicación 13, en el que los filtros paso banda son filtros paso banda de banda triple.

40 15. Aparato, según la reivindicación 9, en el que la fuente de luz de iluminación incluye, además, óptica de enfoque que puede enfocar y difundir luz procedente de la fuente de luz de iluminación.



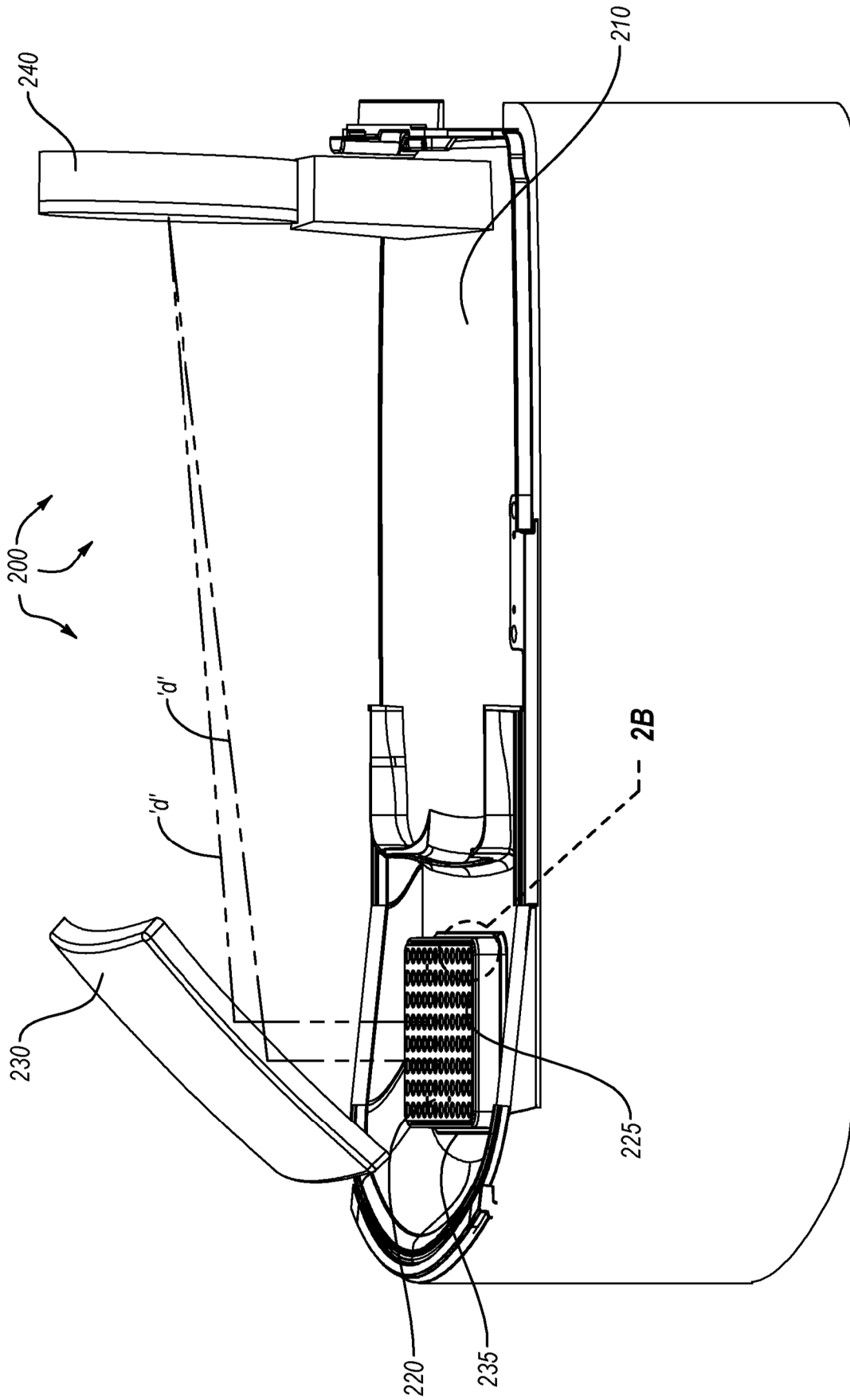


FIG. 2A

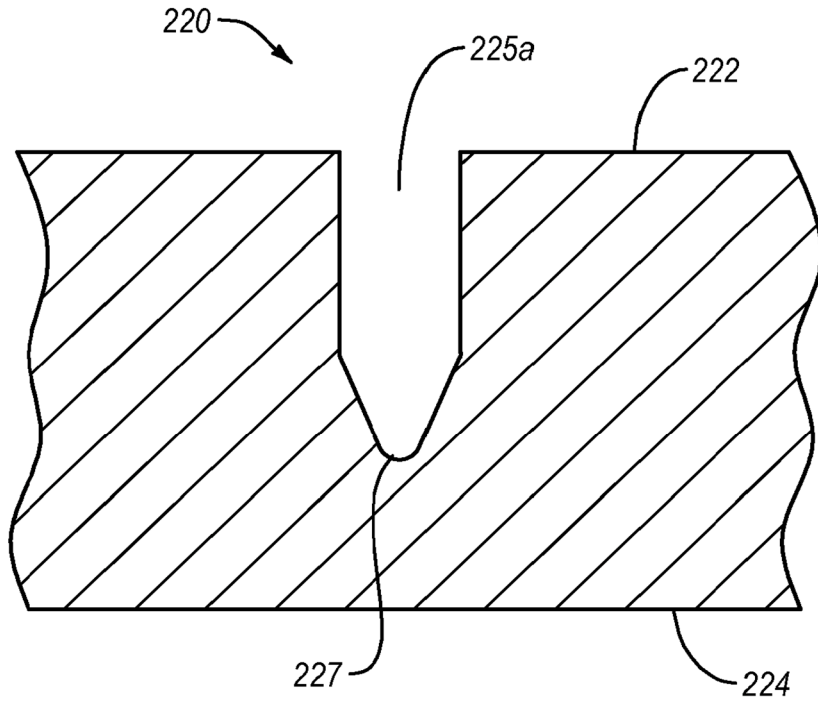


FIG. 2B

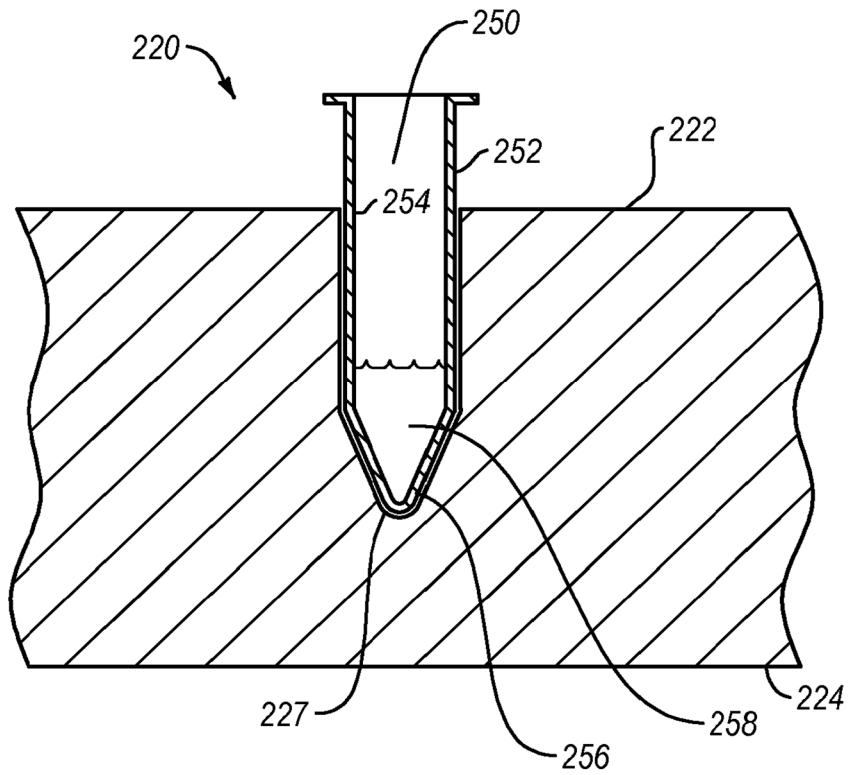


FIG. 2C

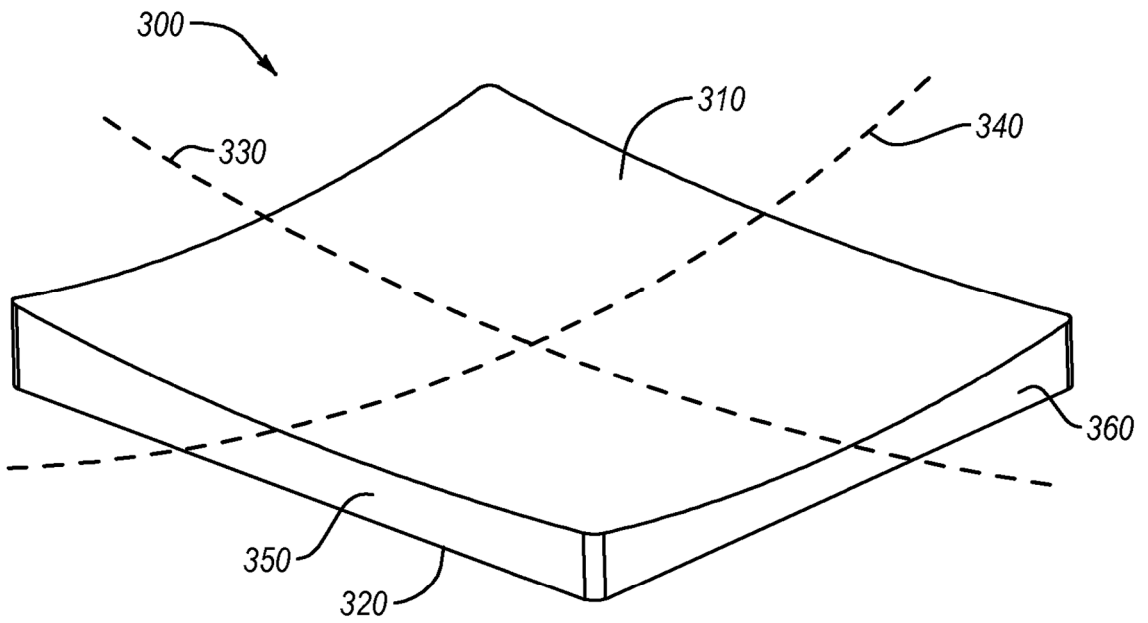


FIG. 3A

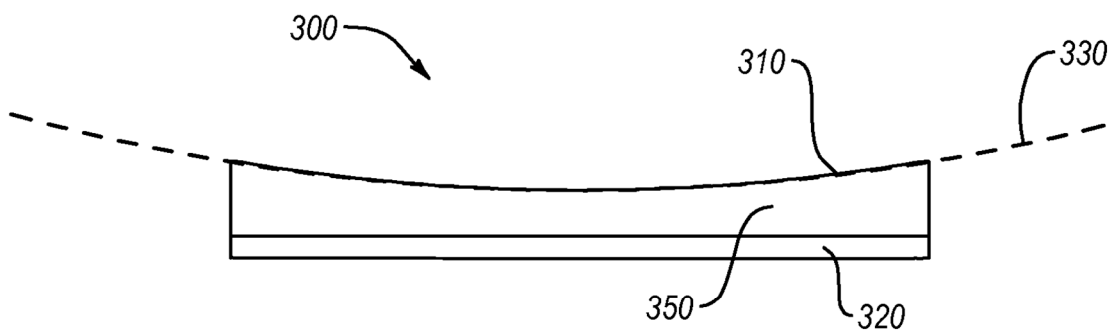


FIG. 3B

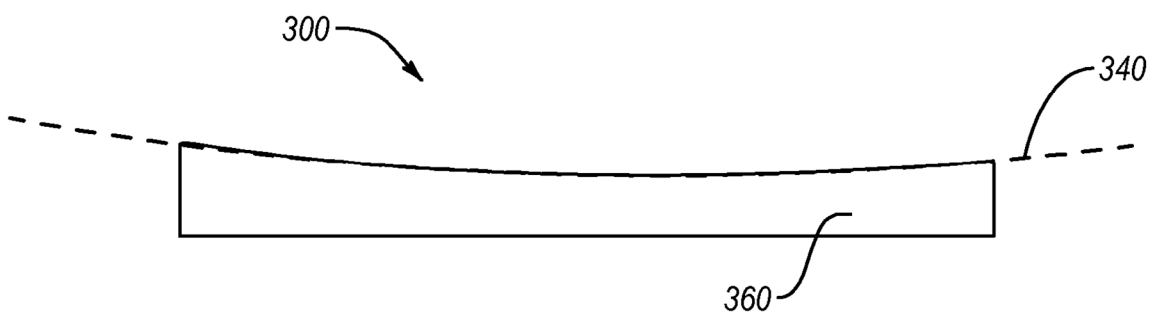


FIG. 3C

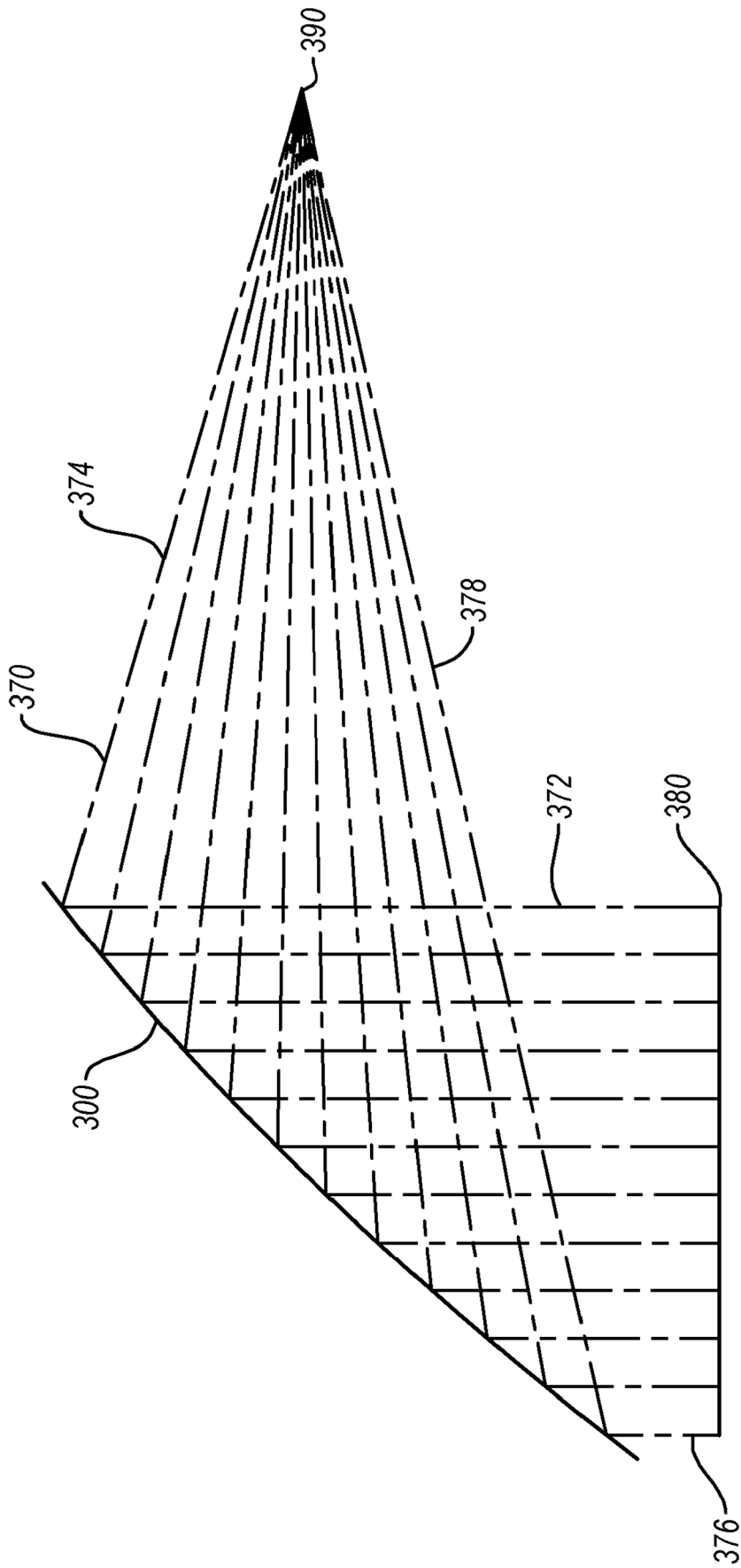


FIG. 3D

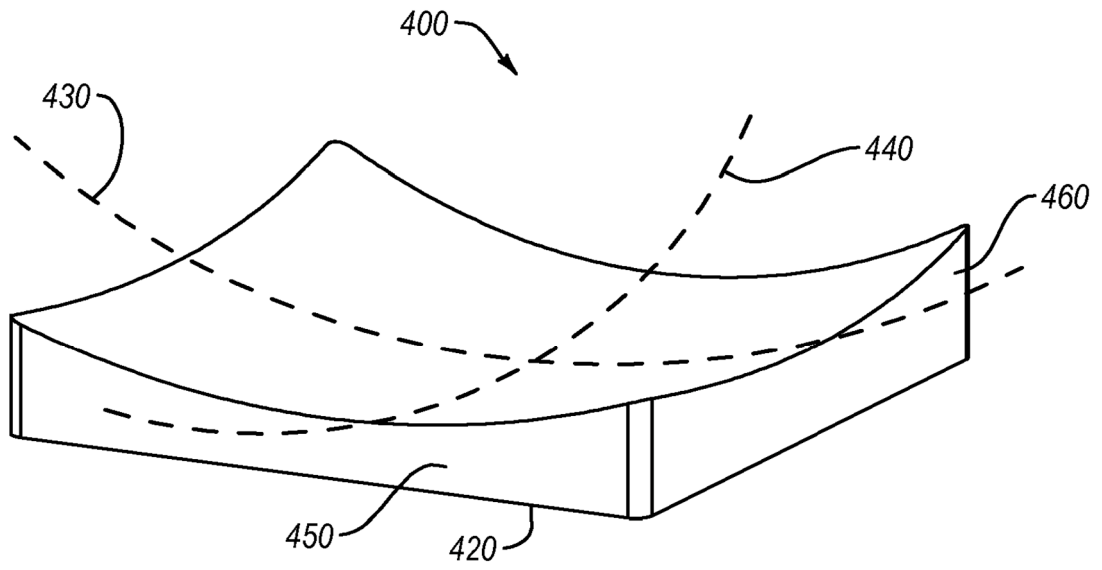


FIG. 4A

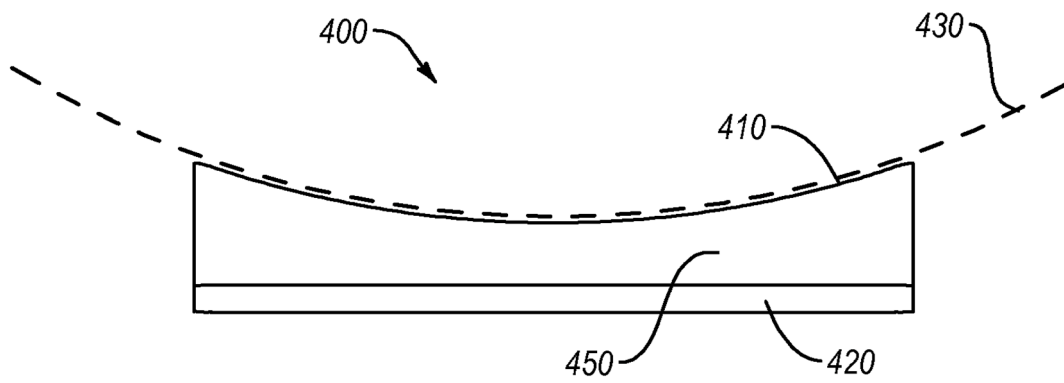


FIG. 4B

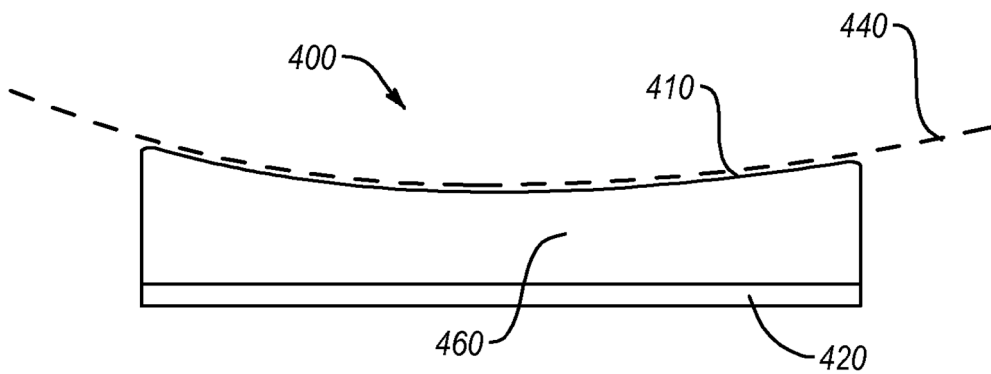


FIG. 4C

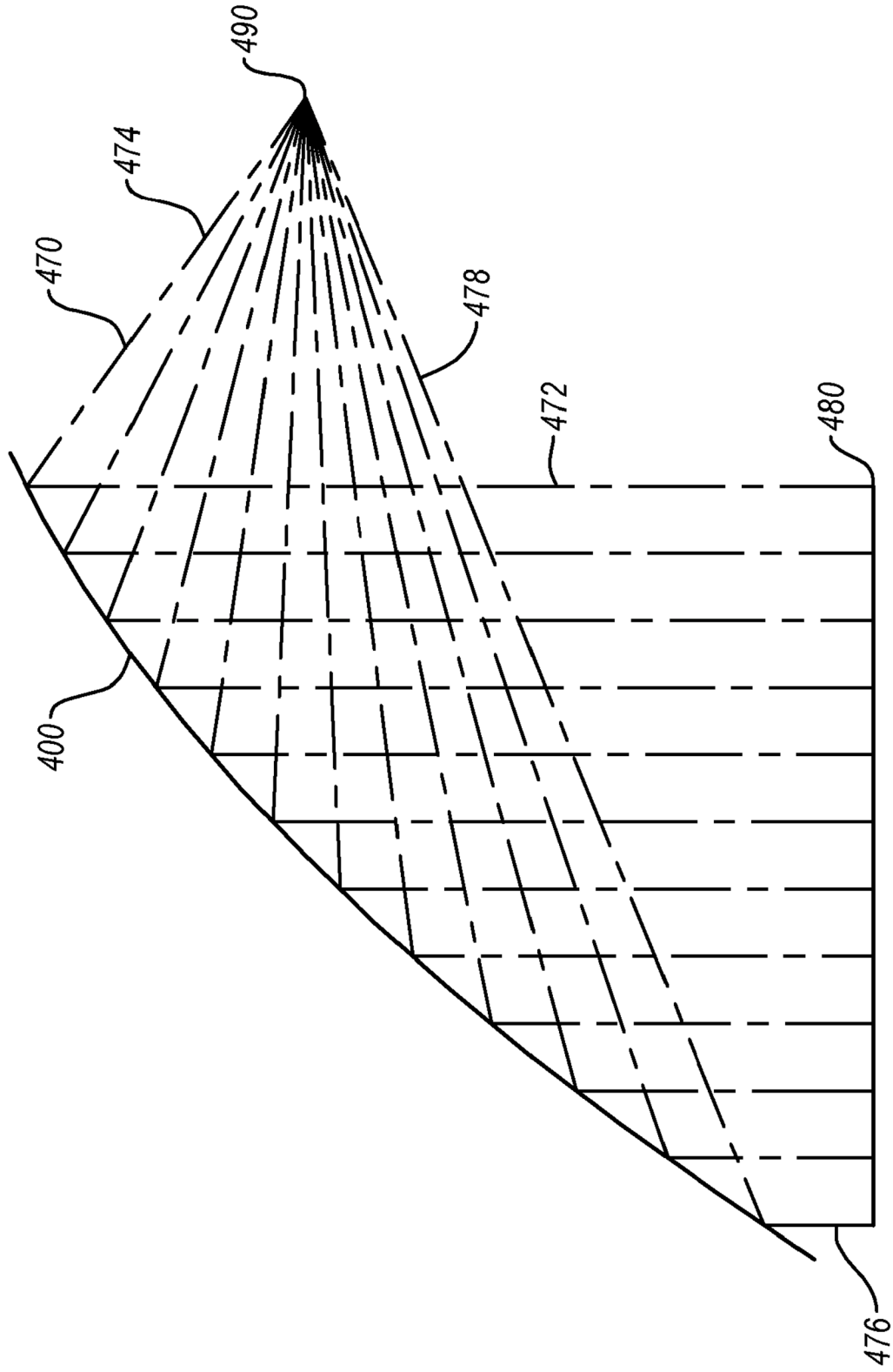


FIG. 4D

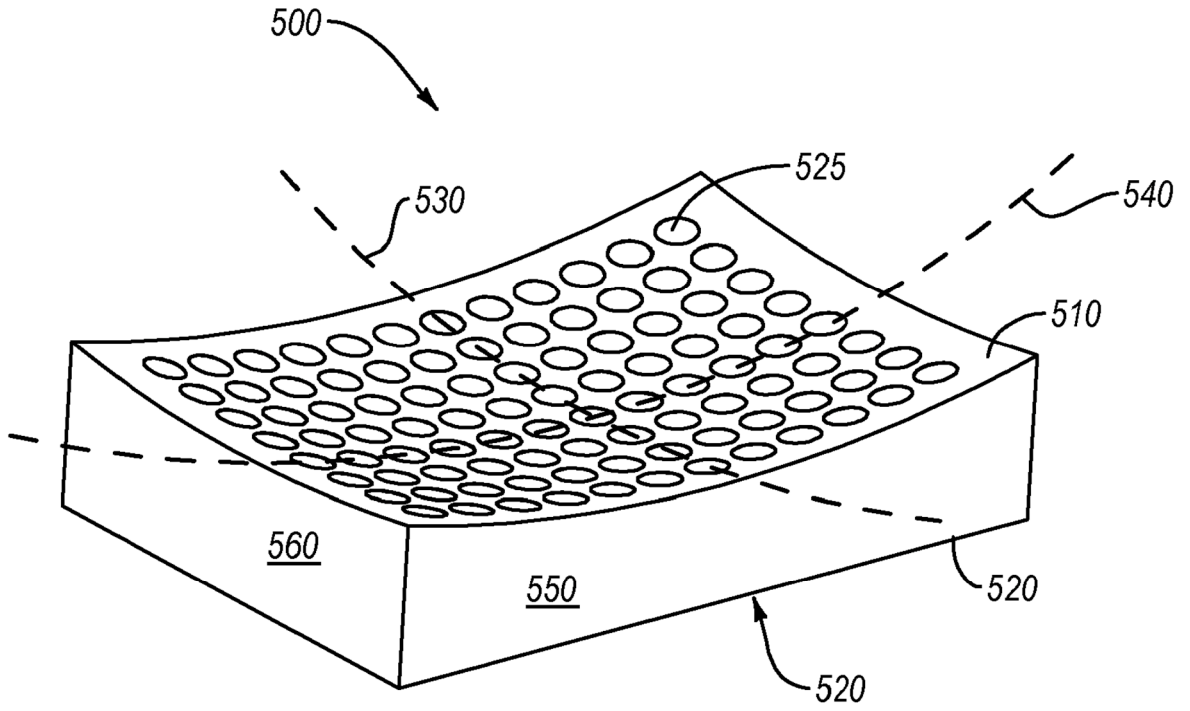


FIG. 5A

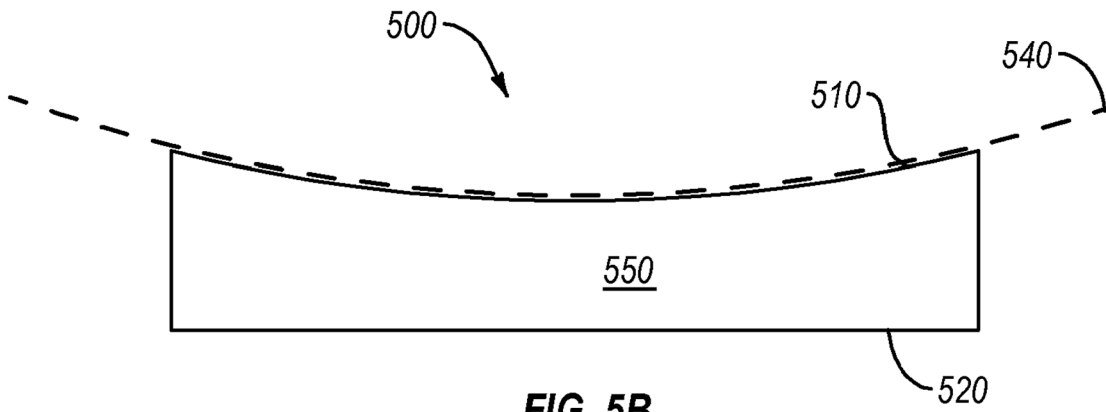


FIG. 5B

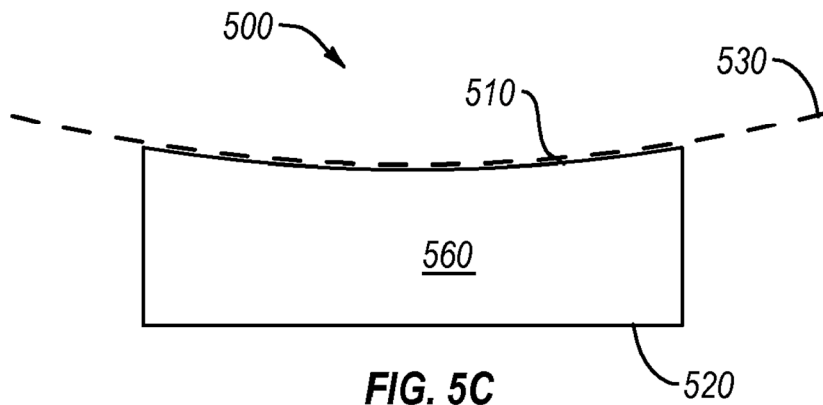


FIG. 5C

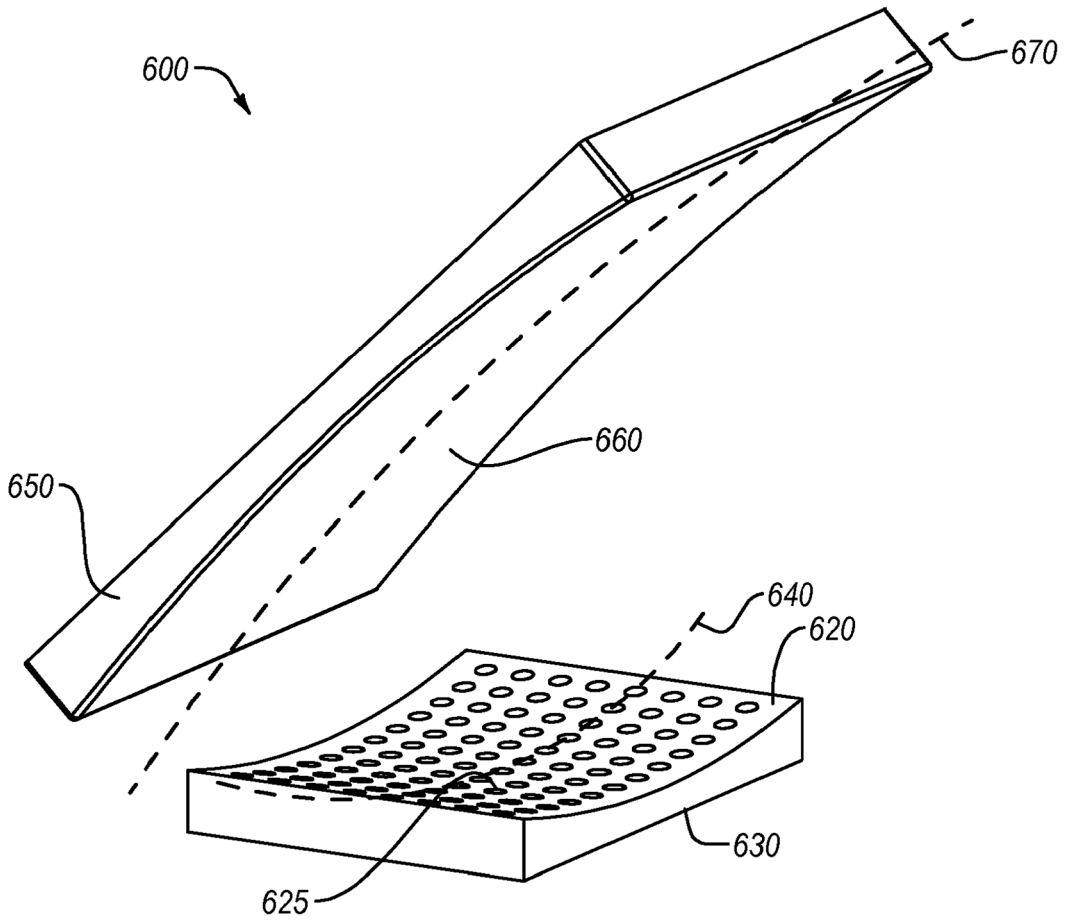


FIG. 6A

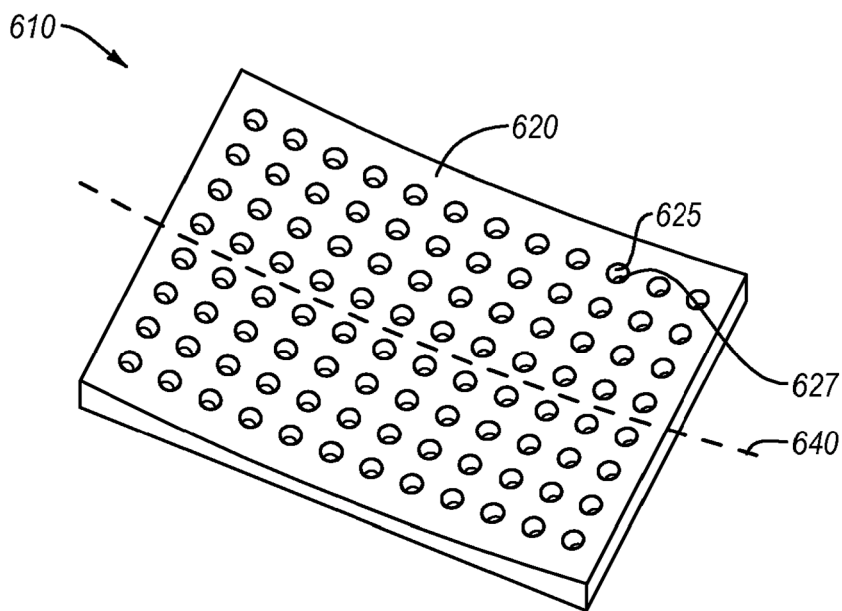


FIG. 6B

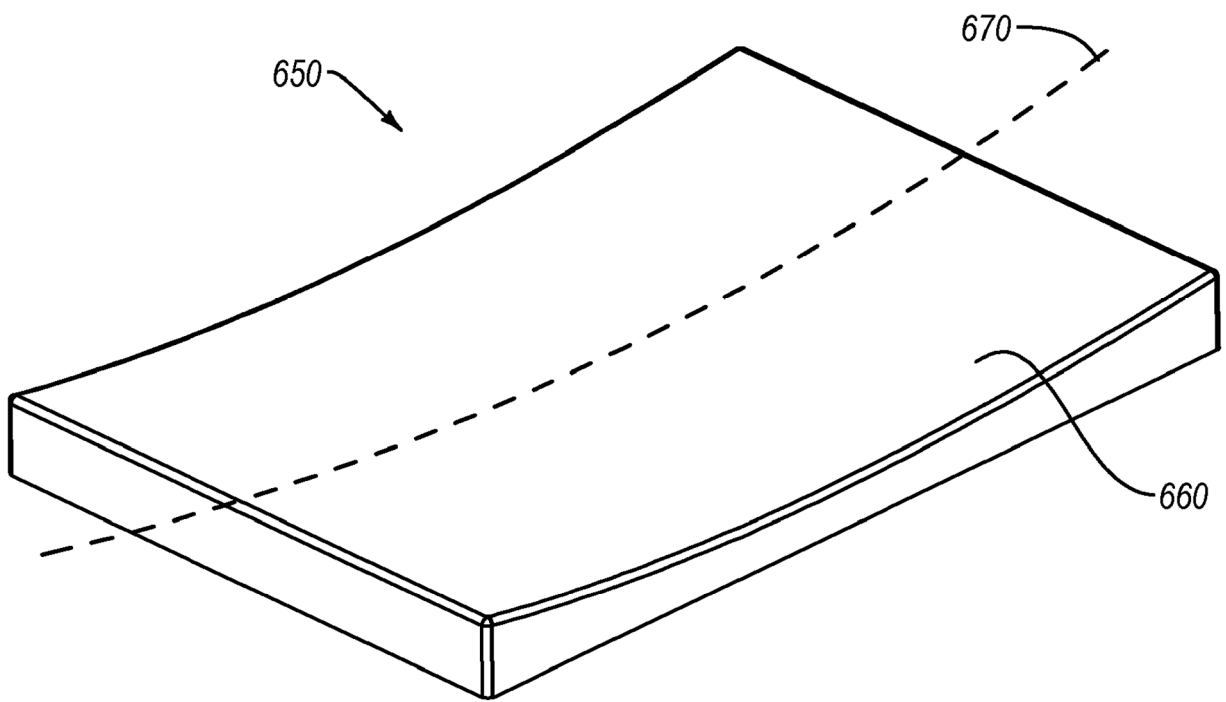


FIG. 6C

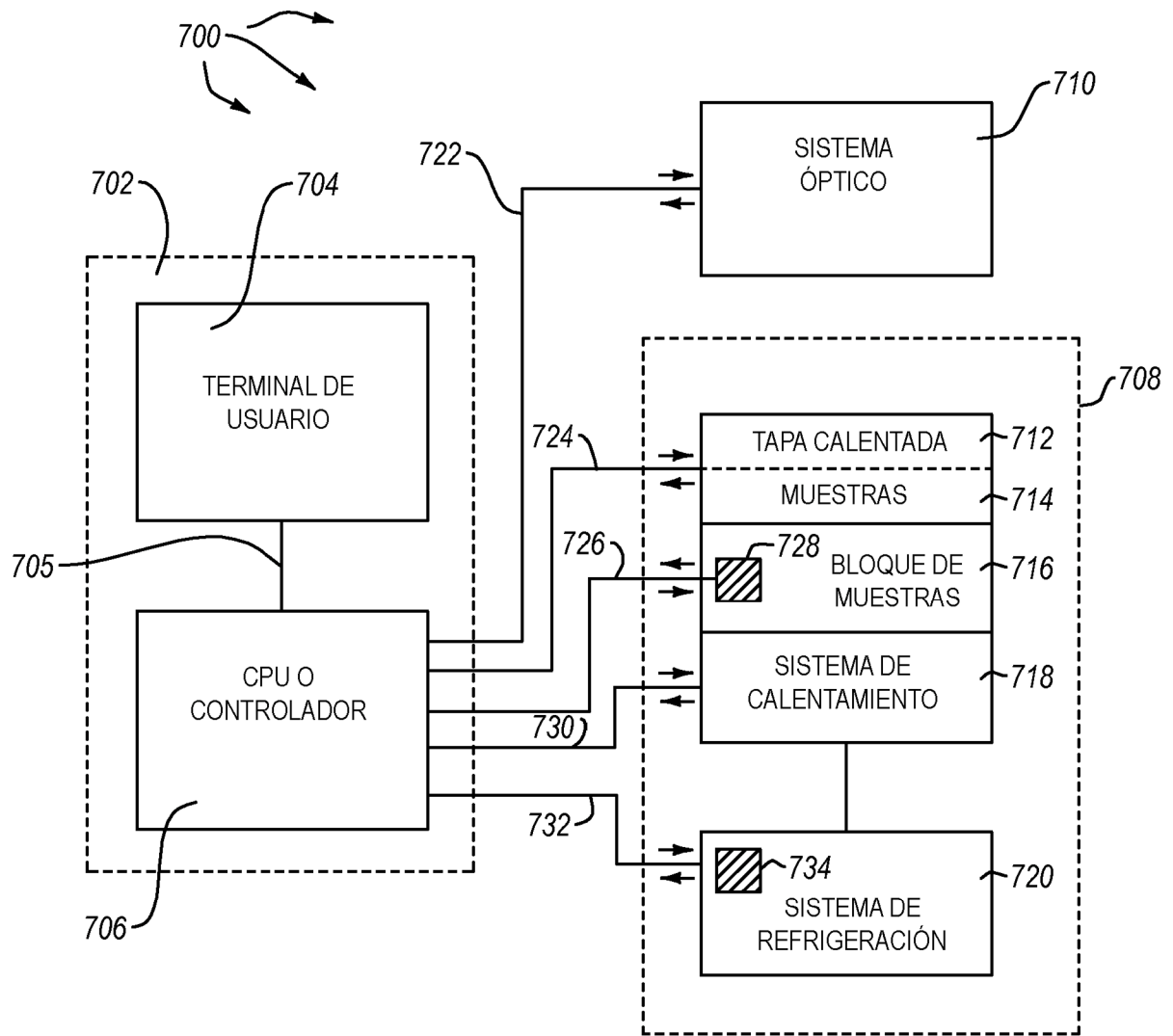


FIG. 7

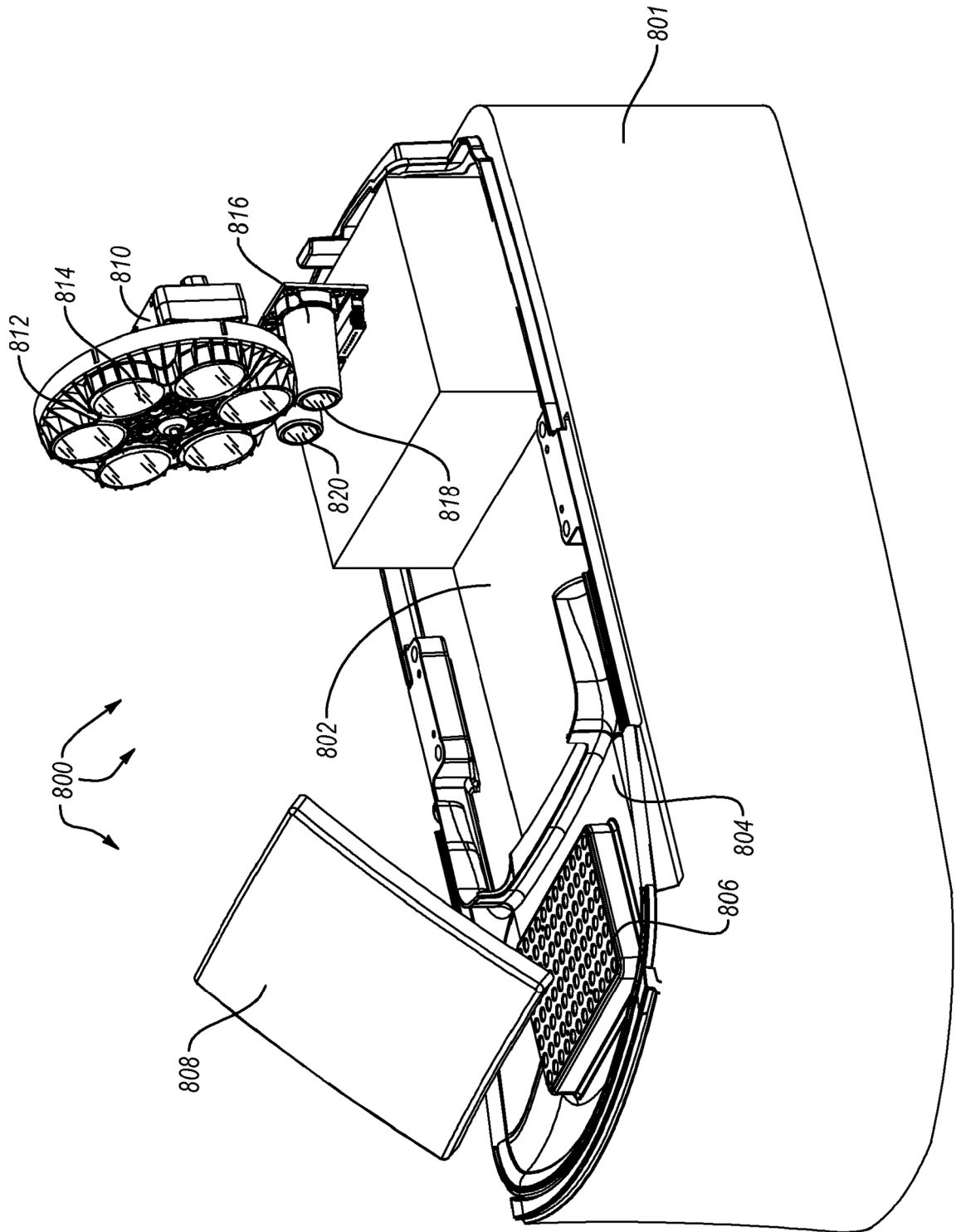


FIG. 8A

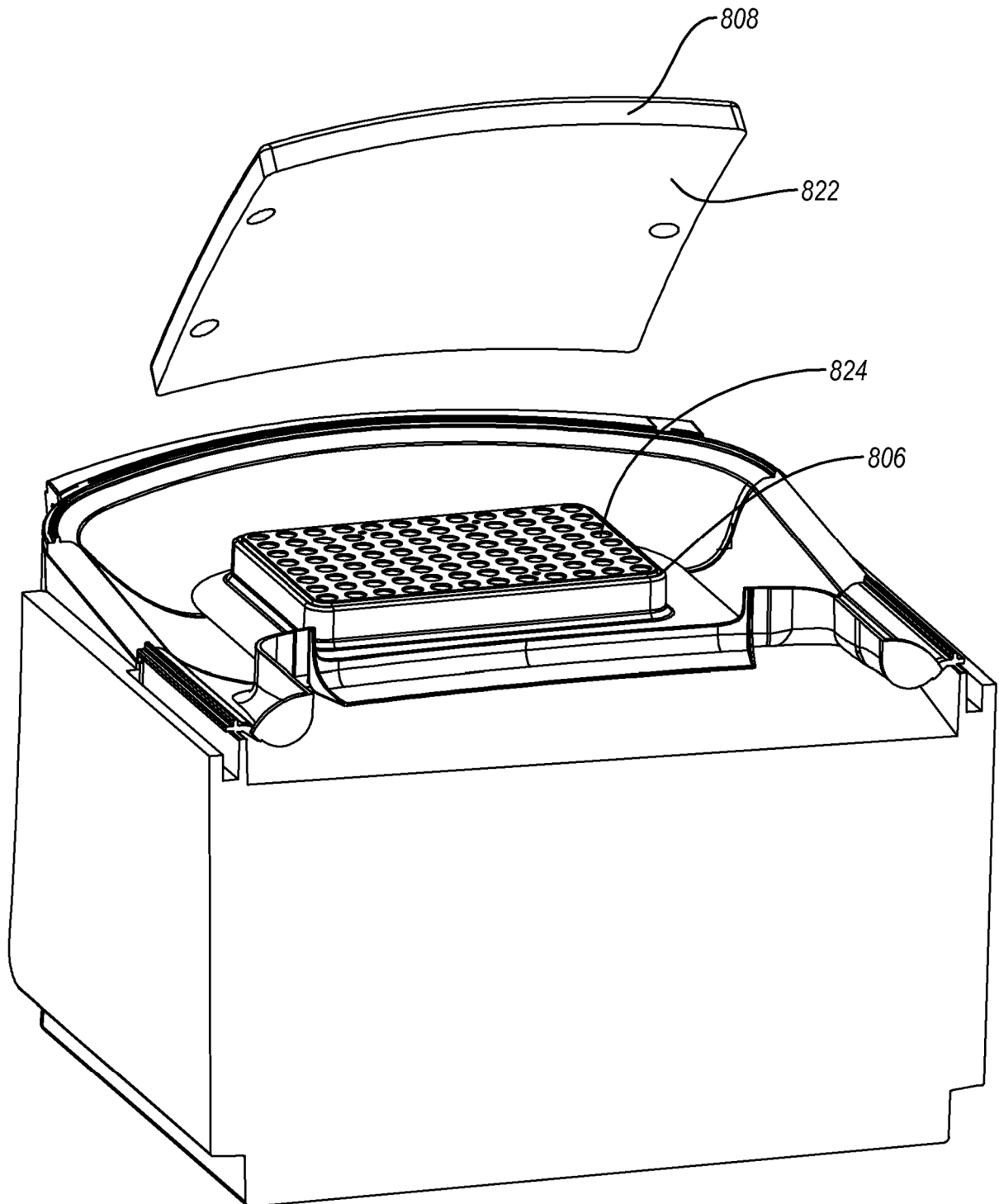


FIG. 8B

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citada por el solicitante es únicamente para mayor comodidad del lector. No forman parte del documento de la Patente Europea. Incluso teniendo en cuenta que la compilación de las referencias se ha efectuado con gran cuidado, los errores u omisiones no pueden descartarse; la EPO se exime de toda responsabilidad al respecto.

Documentos de patentes citados en la descripción

- EP 1750115 A1
- DE 3147433 A1
- US 2011063005 W
- WO 2012075360 A
- US 7670832 B