



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 285 578**

51 Int. Cl.:
G01N 21/64 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **05000863 .0**

86 Fecha de presentación : **18.01.2005**

87 Número de publicación de la solicitud: **1681556**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **19.07.2006**

54

Título: **Visualización de señales de fluorescencia utilizando telecentricidad.**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.11.2007

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.11.2007

73

Titular/es: **F. HOFFMANN-LA ROCHE AG.**
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH

72

Inventor/es: **Gutekunst, Martin;**
Guse, Frank;
Heckmann, Hans-Georg;
Hessling, Martin y
Koenig, Joachim

74

Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 285 578 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

Visualización de señales de fluorescencia utilizando telecentricidad.

5 **Ámbito de la invención**

La presente invención está relacionada con el ámbito del análisis de DNA. Concretamente, la presente invención versa sobre un dispositivo para la visualización en paralelo de la intensidad de fluorescencia procedente de un gran número de puntos.

10

Antecedentes

Los expertos en la materia conocen diversas aplicaciones de las técnicas de fluorescencia para analizar las muestras biológicas. En el caso de las técnicas de electroforesis, se marcan las proteínas o el DNA con sondas fluorescentes para visualizar sus bandas en geles o columnas. Asimismo, muchas aplicaciones de los biochips se han basado hasta el momento en lecturas de fluorescencia, en las que se controla la unión específica de una molécula diana marcada con fluorescencia a una sonda molecular inmovilizada en un soporte sólido. Entre las aplicaciones para el análisis del DNA en fase líquida se encuentran las sondas fluorescentes de hibridación como el colorante de DNA bicatenario SybrGreen I o las sondas de FRET (siglas en inglés de fluorescencia por transferencia de energía resonante) que utilizan dos sondas fluorescentes y la transferencia de energía. Una aplicación muy importante de las técnicas de fluorescencia en fase líquida es la cuantificación a tiempo real de los productos de la PCR, en la denominada PCR a tiempo real.

En todos esos casos, es necesario utilizar un dispositivo lector de fluorescencia que proporcione luz con una determinada longitud de onda para que excite la sonda fluorescente del ensayo y que sea capaz de detectar la luz fluorescente emitida por dicha sonda a una longitud de onda un tanto diferente. Uno de los principales inconvenientes de todos los dispositivos lectores de fluorescencia es la enorme intensidad de la luz de excitación en comparación con la luz fluorescente emitida por la sonda. Por ese motivo, es necesario asegurarse de que el haz de excitación no incida sobre el detector para poder medir las señales de fluorescencia de forma precisa. Es decir, la trayectoria óptica de la luz de excitación ha de ser distinta a la trayectoria óptica de la luz fluorescente, al menos parcialmente.

Resulta relativamente fácil cumplir ese principio de la fluorescencia cuando solo se debe controlar una sonda fluorescente en una fase líquida, p. ej., un capilar. En ese caso, para cumplir con ese requisito es suficiente con, p. ej., una fuente de luz blanca junto con una serie de espejos dicróicos y de filtros. No obstante, si en la muestra hay más de una sonda fluorescente, se debe controlar una distribución lateral de manchas en un soporte sólido o la fluorescencia en una microplaca, y es más difícil cumplir todos los requisitos del dispositivo lector de fluorescencia.

En principio, existen dos estrategias distintas para excitar y medir la fluorescencia con un patrón de distribución lateral de puntos. La primera estrategia consiste en escanear la distribución lateral de puntos, de manera que las señales individuales se analizan sucesivamente de forma individual. La segunda estrategia consiste en iluminar toda la distribución de puntos simultáneamente y en visualizar la fluorescencia correspondiente en, p. ej., un chip CCD. La estrategia del escaneo presenta un inconveniente claro: el soporte debe tener la capacidad de desplazarse en dos dimensiones (WO 03/069391, DE 102 00 499), el detector debe presentar la capacidad de desplazarse respecto al soporte (US 2002/159057), el detector debe presentar la capacidad de desplazarse en una dimensión y el soporte en la otra o los elementos ópticos deben disponer de sistemas de barrido en una o dos dimensiones, p. ej., espejos galvanométricos. Por otro lado, la principal dificultad que presenta la estrategia que consiste en iluminar todo el soporte a la vez es garantizar que la iluminación de toda la zona sea homogénea. Una alternativa a la iluminación homogénea de toda la distribución de puntos es la utilización de una serie de fuentes de luz, de manera que cada punto de la distribución es iluminado por su propia fuente lumínica. En DE 101 31 142 se describe esa estrategia para evaluar una PCR en un termociclador con un gran número de pocillos mediante un divisor de haz y una serie de diodos emisores de luz (LED, siglas en inglés) como iluminación. En DE 101 55 142 se describe la valoración de señales fluorescentes en campo oscuro, en la que los microchips también se iluminan con una serie de LED, pero en esa realización no era necesaria la presencia de un divisor de haz.

En relación con la necesidad de separar las trayectorias ópticas del haz de excitación y de la luz fluorescente, al menos parcialmente, existen también dos posibilidades distintas. La primera opción consiste en la denominada epiiluminación, en la que se utilizan divisores de haz y el haz de excitación y la luz fluorescente comparten al menos parte del tren óptico. La segunda posibilidad consiste en la utilización de iluminación oblicua. En este caso, el haz de excitación se dispone de manera que presente cierto ángulo respecto al ángulo normal de la superficie del soporte y la reflexión correspondiente del haz de excitación se sitúa fuera del ángulo de aceptación del sistema de detección (p. ej. US 2002/0005493 A1, EP 1 275 954 A2).

En US 2003/0011772 A1 se describe un dispositivo óptico para observar simultáneamente un gran número de colorantes fluorescentes en una sonda utilizando un divisor de haz. En DE 197 48 211 A1 se describe un sistema para valorar las señales de fluorescencia generadas en los pocillos de una placa de microtitulación utilizando simultáneamente un divisor de haz, una lente de campo y una serie de lentes que enfocan la luz hacia cada uno de los pocillos. La detección se lleva a cabo proyectando la luz en un chip de fotodiodos o en un chip CCD. La luz fluorescente reco-

gida en esta realización del sistema viene dada por la cantidad de colorantes excitados por el cono de luz de la lente convergente y, por tanto, depende del nivel de llenado del pocillo. La patente WO 99/60381 reivindica un instrumento para controlar reacciones de PCR simultáneas en un gran número de viales en un termociclador. Los componentes ópticos de este instrumento incluyen nuevamente un divisor de haz, una lente de campo, una serie de lentes para enfocar individualmente cada vial y un sistema de detección para enfocar la luz emitida hacia, p. ej., un detector CCD. Dada la necesidad de disponer de una serie de lentes para cada vial, el tamaño y la densidad lateral de puntos se ve limitada. La patente JP 2002014004 describe un sistema fluorimétrico para valorar la fluorescencia generada en un gran número de pocillos. Los componentes ópticos constan de un divisor de haz y un sistema de lentes para iluminar los pocillos colectivamente con una luz que es paralela a la dirección de la profundidad de los pocillos. No obstante, el sistema óptico que forma la imagen condensa la luz en un sistema de detección. En US 6 498 690 B1 se describe un método para realizar ensayos de visualización con un objetivo que consta de una lente telecéntrica. La patente US 6 246 525 B1 reivindica un dispositivo para la visualización de un soporte de muestras y que consta de una lente Fresnel.

La patente EP 0 987 540 describe un dispositivo de imagen para ensayos de fluorescencia que consta de una unidad de imagen que incluye una serie de lentes telecéntricas. La patente EP 1 406 082 describe un lector de fluorescencia con una trayectoria telecéntrica del haz de excitación.

Así, era objeto de la presente invención proporcionar un dispositivo mejorado para controlar simultáneamente las señales de fluorescencia con una distribución lateral de puntos optimizando la trayectoria óptica para obtener una iluminación homogénea y una detección precisa. En un aspecto de la presente invención, el problema a resolver está relacionado con mejoras en el control de una PCR multiplex a tiempo real en una placa de microtitulación.

Descripción breve de la invención

Así, la invención versa sobre un instrumento óptico para visualizar la fluorescencia de una estructura con múltiples puntos individuales, que comprende la excitación homogénea a lo largo de toda el área de la estructura, así como una emisión precisa de las señales fluorescentes correspondientes.

Concretamente, la invención versa sobre un instrumento óptico que analiza simultáneamente un gran número de amplificaciones por PCR que están teniendo lugar en los pocillos de una placa de microtitulación a tiempo real o que visualiza la intensidad de la fluorescencia de un microchip para medir las interacciones entre una diana y su sonda específica.

Uno de los aspectos objeto de la presente invención es un instrumento óptico para visualizar señales de fluorescencia de múltiples puntos individuales que comprende lo siguiente:

- un sistema de sujeción de un soporte plano a una estructura de múltiples puntos individuales,
- al menos una fuente lumínica para emitir luz que consta de al menos una frecuencia de excitación,
- un transductor dispuesto de manera que reciba las señales de fluorescencia de dicha estructura de múltiples puntos individuales, que se configura para producir datos primarios computables,
- una lente de campo dispuesta de manera que transfiera la luz de excitación de dicha fuente lumínica a dicha estructura de múltiples puntos individuales y transferir señales de fluorescencia de dicha estructura de múltiples puntos individuales a dicho transductor,
- una lente de excitación colocada de forma que transfiera la luz de excitación de dicha fuente lumínica a dicha lente de campo y
- una lente de proyección colocada de forma que transfiera las señales de fluorescencia de dicha lente de campo a dicho transductor,

en el que dicha lente de campo se dispone de forma que produzca luz de excitación con un ángulo de incidencia α con dicho soporte plano de dicha estructura de múltiples puntos individuales que sea mayor de 0° y

en el que la trayectoria de la luz de excitación y la trayectoria de la luz fluorescente de emisión son telecéntricas en la cara de dicha lente de campo correspondiente al objeto.

En el contexto de esta invención una estructura de múltiples puntos individuales abarca objetos que están compuestos por dos o más puntos separados espacialmente y distribuidos de forma lateral. Los puntos pueden ser, p. ej, pocillos de una placa de microtitulación o áreas de una lámina de cristal con superficie habilitada. En la mayoría de casos la estructura de múltiples puntos individuales se dispondrá de forma uniforme y cada punto tendrá un contenido diferente para realizar un análisis múltiple. Está dentro del ámbito de la invención que el soporte plano de la estructura sea una fase sólida plana. En el caso de un microchip, el soporte plano de la estructura es la superficie de esa fase sólida plana, sobre la que se disponen los puntos. En el caso de una placa de microtitulación, el soporte plano de la estructura es el plano en el que se sitúan las oberturas de los pocillos. El soporte plano de la estructura se fija mediante sistemas de sujeción para estabilizar la posición de cada punto individual en la posición deseada de la trayectoria óptica.

ES 2 285 578 T3

Dentro del ámbito de la invención, la expresión “fuente lumínica” (LS, siglas en inglés) incluye iluminantes emisores de luz con una única longitud de onda o con un gran número de frecuencias distintas. Asimismo, la fuente lumínica puede ser un conjunto de dichos iluminantes.

5 En el contexto de esta invención, un transductor (Det) es un dispositivo capaz de convertir la luz visible en señales eléctricas que puedan ser procesadas por un ordenador, p. ej., un chip CCD.

Dentro del ámbito de esta invención un elemento óptico telecéntrico es un elemento óptico con un tope de apertura que se proyecta hacia el infinito por los elementos ópticos situados entre el tope de apertura y el objeto. Es decir, 10 los rayos principales de un elemento óptico telecéntrico son casi paralelos dentro del espacio del objeto. El término “rayos principales” se refiere a todos los rayos que pasan por el centro del tope de apertura. Los términos “objeto”, “plano del objeto” y “espacio del objeto” se utilizan para describir el soporte plano (2) con la estructura de múltiples puntos individuales (3). En dicho elemento telecéntrico, la disposición de lentes de excitación (10) y la disposición de lentes de emisión (12) poseen su propio tope de apertura. Dicho elemento óptico telecéntrico es telecéntrico a la 15 trayectoria de excitación y a la trayectoria de detección. Cada punto del objeto en un plano perpendicular al eje óptico corresponde a un rayo principal de excitación, así como a un rayo principal de detección. Dado que todos los rayos principales de excitación así como todos los rayos principales de detección son casi paralelos, queda garantizada una buena homogeneidad lateral en el plano del objeto y los puntos situados en el centro de la estructura son comparables a aquellos situados en los bordes de la estructura.

20 A lo largo de la presente invención, un elemento óptico telecéntrico siempre comprende una lente de campo. En el contexto de esta invención, la lente de campo se sitúa cerca del objetivo, es atravesada por la luz de excitación y las señales de fluorescencia, puede comprender uno o más componentes y contribuye a la telecentricidad en el espacio del objeto o de la imagen en combinación con componentes ópticos adicionales del aparato. El componente o los 25 componentes adicionales de la lente de campo pueden ser también lentes separadas espacialmente.

La lente de campo de la presente invención transfiere luz de excitación de la fuente lumínica a la estructura de múltiples puntos individuales y transfiere señales fluorescentes desde la estructura de múltiples puntos individuales hacia el transductor. Este hecho no excluye que se introduzcan componentes ópticos adicionales en la trayectoria del 30 haz, p. ej. entre la fuente lumínica y la lente de campo, entre la lente de campo y el transductor o entre la lente de campo y la estructura de múltiples puntos individuales.

El ángulo de incidencia α se define como el ángulo entre los rayos principales casi paralelos del haz de luz de excitación y la normal de la interficie, que en el ámbito de esta invención es el soporte de la estructura.

35 Otro aspecto de esta invención es un instrumento para PCR a tiempo real que comprende lo siguiente:

- un instrumento óptico de acuerdo con la invención y
- 40 - un sistema para calentar y enfriar el soporte con uno o más pocillos que contienen cada uno una mezcla de reacción que sirve para realizar una reacción de PCR.

Dentro del ámbito de esta invención, entre los sistemas para calentar y enfriar se encuentra cualquier sistema capaz de controlar y alterar la temperatura de la estructura de múltiples sitios individuales de forma cíclica para llevar a cabo 45 amplificaciones cíclicas por PCR de ácidos nucleicos. Preferiblemente, los sistemas de sujeción pueden ser calentados y enfriados gracias al contacto térmico con el soporte plano de la estructura de múltiples puntos individuales.

Otro aspecto de la presente invención es un sistema para llevar a cabo y controlar un gran número de reacciones de PCR simultáneas a tiempo real que comprende lo siguiente:

- 50 - una placa con múltiples pocillos con un gran número de puntos individuales que contienen cada uno una mezcla de reacción que sirve para llevar a cabo una reacción de PCR,
- entidades fluorescentes de unión al DNA y
- 55 - un instrumento para PCR a tiempo real de acuerdo con la invención que comprende un instrumento óptico de acuerdo con la invención para iluminar totalmente la placa con múltiples pocillos con luz telecéntrica y detectar las señales de fluorescencia de cada pocillo de dicha placa con un transductor colocado de manera que reciba las señales de fluorescencia correspondientes para producir datos primarios computables.

60 A lo largo de la presente invención, las moléculas fluorescentes de unión al DNA son todo colorantes fluorescentes o sistemas de colorantes fluorescentes ya conocidos por los expertos en la materia que pueden ser utilizados para detectar el DNA amplificado, como p. ej. colorantes de unión a DNA bicatenario, sondas TaqMan, balizas moleculares, sondas con marcador único o sondas de hibridación de FRET.

65 Otro aspecto de la presente invención es un método para amplificar, detectar o cuantificar múltiples secuencias diana de DNA que comprende lo siguiente:

- proporcionar una composición o mezcla de reacción capaz de llevar a cabo una reacción de PCR,
- someter dicha mezcla de reacción a un protocolo de termociclado de manera que pueda producirse la amplificación de dichas múltiples secuencias diana de DNA y

5

- controlar la presencia y la cantidad de cada secuencia de DNA al menos una vez después una serie de ciclos de amplificación utilizando moléculas fluorescentes de unión al DNA y un instrumento para PCR a tiempo real de acuerdo con la invención.

10 La composición o mezcla de reacción capaz de llevar a cabo reacciones de PCR comprende a lo largo de esta invención: soluciones tampón, nucleótidos, enzimas, cebadores y las moléculas fluorescentes de unión a DNA.

15 Un protocolo de termociclado es el protocolo que define cronológicamente el tratamiento térmico de la composición de PCR, las temperaturas de desnaturalización e hibridación, el número de ciclos de amplificación y el tiempo de calentamiento y enfriamiento.

Descripción de las figuras

20 Figura 1 Dibujo esquemático de una realización del instrumento óptico según la invención.

Figura 2 Dibujo esquemático de otra realización del instrumento óptico según la invención que comprende una unidad reflectora del haz de luz (11): A) Excitación y B) Emisión.

25 Figura 3 Dibujo tridimensional de una realización del instrumento óptico según la invención que comprende una unidad reflectora del haz de luz 11.

Figura 4 Esquema ilustrativo de la correlación entre los parámetros del instrumento óptico.

30 Figura 5 Sensibilidad del instrumento óptico.

Figura 6 Reproducibilidad de las señales de fluorescencia.

Figura 7 Señales de fluorescencia en una placa de microtitulación.

35 Figura 8 Intensidad de la fluorescencia en función del llenado de los pocillos.

Descripción detallada de la invención

40 Es objeto de la presente invención un instrumento óptico para visualizar señales de fluorescencia desde múltiples puntos individuales que comprende lo siguiente:

- un sistema de sujeción de un soporte plano a una estructura de múltiples puntos individuales,

45 - al menos una fuente lumínica para emitir luz que consta de al menos una frecuencia de excitación,

- un transductor dispuesto de manera que reciba las señales de fluorescencia de dicha estructura de múltiples puntos individuales, que se configura para producir datos primarios computables,

50 - una lente de campo dispuesta de manera que transfiera la luz de excitación de dicha fuente lumínica a dicha estructura de múltiples puntos individuales y para que transfiera señales de fluorescencia de dicha estructura de múltiples puntos individuales a dicho transductor,

55 - una lente de excitación colocada de forma que transfiera la luz de excitación de dicha fuente lumínica a dicha lente de campo y

- una lente de emisión colocada de forma que transfiera las señales de fluorescencia de dicha lente de campo a dicho transductor,

60 en el que dicha lente de campo produce luz de excitación con un ángulo de incidencia α respecto a dicho soporte plano de dicha estructura de múltiples puntos individuales que es mayor de 0° y

en el que la trayectoria de la luz de excitación y la trayectoria de la luz de las señales fluorescente son telecéntricas respecto a la cara de dicha lente de campo (6) que corresponde al objeto.

65 Los expertos en la materia conocen de la existencia de un gran número de instrumentos capaces de visualizar imágenes de fluorescencia. Si el instrumento óptico fuese capaz de visualizar simultáneamente las señales de fluorescencia de una estructura de múltiples puntos individuales, p. ej., los pocillos de una placa de microtitulación o los puntos de un microchip, se debe garantizar que la excitación de los colorantes y la emisión de las señales de fluorescencia en

ES 2 285 578 T3

el centro y en el borde de la estructura sean comparables. Además, incluso si se consigue cumplir con la necesaria distribución homogénea de la intensidad a lo largo del haz de luz, el alineamiento del soporte plano es todavía muy importante para garantizar que el soporte completo se encuentre dentro del plano focal del elemento óptico de emisión así como en el del elemento óptico de excitación. Además, surgen algunos problemas adicionales cuando el soporte
5 tiene profundidad como en el caso de las placas de microtitulación.

Una solución a los problemas antes mencionados es la utilización de elementos ópticos telecéntricos. En un elemento óptico telecéntrico, los rayos principales que emanan de cada punto del objeto son casi paralelos. Por tanto, todos los puntos del objeto dentro de un campo de visión definido son observados con casi la misma perspectiva e
10 intensidad. Es decir, el elemento óptico telecéntrico posee una gran profundidad de campo y un perfil de excitación o emisión homogéneo.

Se pueden caracterizar las propiedades de un elemento óptico mediante su apertura numérica (NA) que en general debe ser lo más grande posible para obtener una sensibilidad elevada y una buena resolución óptica:

$$15 \quad NA = n \sin A,$$

en la que n es el índice de refracción del medio y A el ángulo de apertura.

20 Para diseñar un instrumento óptico de excitación telecéntrica para una distribución lateral de puntos y una emisión telecéntrica de las señales de fluorescencia de dichos puntos se deben tener en cuenta varios aspectos.

Por un lado, el valor NA debe ser lo más grande posible, porque un valor NA pequeño de un elemento óptico de emisión equivale a una baja resolución óptica y un valor NA pequeño de un elemento óptico de excitación equivale a un malgasto de energía de iluminación para la excitación. Por otro lado, al minimizar el valor NA la profundidad de enfoque del elemento óptico telecéntrico, que es de suma importancia, puede incrementar si la estructura de múltiples puntos individuales posee cierta profundidad, como en el caso de las placas de microtitulación. Además, también es preferible un valor de NA pequeño desde un punto de vista comercial, porque un elemento óptico de poca apertura supone, en general, menos costes de producción.

30 Si el instrumento óptico telecéntrico debe aplicarse para un amplio abanico de frecuencias, el elemento óptico debe ser también acromático. Para la emisión misma de la fluorescencia deben cumplirse incluso más requerimientos, dado que la emisión de la fluorescencia debe tener la escala apropiada para reproducir correctamente la distribución lateral de puntos en el transductor. Además, deben controlarse los errores de imagen como las aberraciones cromáticas o esféricas, la coma, el astigmatismo o la curvatura del campo.

Existen diversas formas de crear elementos ópticos telecéntricos. En general, un elemento óptico telecéntrico posee un diseño multilente en el que se dispone más de una lente de forma sucesiva en la trayectoria del haz. Se puede preparar un elemento que sea telecéntrico en el plano del objeto o telecéntrico en el plano de la imagen o telecéntrico en ambos planos, el denominado elemento telecéntrico doble. Asimismo, es posible iluminar un objeto con luz telecéntrica o controlar un objeto de forma telecéntrica. En general es suficiente proporcionar un elemento óptico con telecentricidad en el plano del objeto, dado que así ya se garantiza una iluminación homogénea del objeto completo de forma lateral, así como en la tercera dimensión y la captación precisa de luz irradiada procedente del objeto.

45 En el ámbito se conocen instrumentos que utilizan elementos ópticos telecéntricos para visualizar señales de fluorescencia, pero la excitación se lleva a cabo generalmente de forma no telecéntrica, p. ej. iluminación posterior, iluminación oblicua o mediante campo evanescente. A lo largo de esta invención, tanto la excitación de los múltiples puntos individuales como la emisión de las señales de fluorescencia de los múltiples puntos individuales se lleva a cabo de forma telecéntrica.

Las Figuras 1 y 2 muestran dibujos esquemáticos de dos instrumentos ópticos de acuerdo con realizaciones preferidas de la invención que se detallan a continuación.

55 La parte central de todos los elementos ópticos telecéntricos es la lente de campo. Esta lente se encuentra cerca del objeto y determina el diámetro del campo de visión del instrumento. Por tanto, el diámetro de esta lente tiende a aumentar de tamaño cuando la estructura de múltiples puntos individuales se distribuye a lo largo de una gran área. Las lentes de campo pueden ser una lente única o acromáticas que contienen, p. ej., dos lentes juntas. En esta invención se puede utilizar una lente de campo especial como las lentes Fresnel. Una lente Fresnel tiene una curvatura compleja especial con múltiples regiones estrechas en al menos una superficie óptica efectiva que proporcione las mismas propiedades telecéntricas que una lente de campo. En la mayoría de casos, las lentes Fresnel solo tienen una superficie con múltiples regiones estrechas que se encuentran sostenidas en una superficie plana perpendicular al eje óptico y, por tanto, son más finas en comparación a las lentes de campo normales. En casos especiales, se utilizan lentes Fresnel que posean una superficie curvada de soporte adicional o que posean múltiples regiones estrechas en ambos lados de la lente. Además, las lentes Fresnel están hechas a veces de material plástico y, por tanto, pueden resultar más económicas que las lentes de campo grandes hechas de vidrio. Pero por otro lado, la calidad de la imagen, especialmente la referente al contraste y a las interferencias de estas lentes Fresnel, es menor en comparación con las lentes de campo normales a causa de la dispersión de la luz en esos puntos de la lente que poseen una curvatura discontinua.

ES 2 285 578 T3

Uno de los problemas que tienen en común todos los instrumentos de visualización de fluorescencia es la enorme diferencia entre las intensidades de la luz de excitación y las señales de fluorescencia. En consecuencia, la relación entre señal-ruido es insuficiente, si la luz de excitación incide a la vez que las señales de fluorescencia en el transductor. Existen dos estrategias fundamentales para solucionar este problema, que son la utilización de divisores de haz y la iluminación oblicua.

Un divisor de haz es normalmente un espejo dicroico que deja pasar o refleja la luz dependiendo de su longitud de onda y, por tanto, se puede utilizar para separar dos componentes de un haz de luz en distintas direcciones en el espacio. Para su utilización en un instrumento óptico para visualizar imágenes de fluorescencia este espejo dicroico debe reflejar la luz de excitación y ser transparente para la luz fluorescente o viceversa. El principal inconveniente de utilizar un divisor de haz es que únicamente se puede utilizar con un número limitado de colorantes fluorescentes que posean frecuencias de excitación y señales de fluorescencia en ventanas definidas de frecuencias. Por tanto, cuando se debe utilizar otro colorante fluorescente, también se debe procurar otro divisor de haz para el instrumento óptico. Esto resulta caro y requiere tiempo.

Se puede evitar la utilización de un divisor de haz utilizando iluminación oblicua. En ese caso, el haz de luz de excitación posee un ángulo de incidencia con dicho soporte plano (2) de dicha estructura de múltiples puntos individuales (3) que es mayor de 0° . Como resultado, la reflexión de dicho haz de luz de excitación tiene lugar con un ángulo correspondiente relativo también a dicho soporte plano y se dirige desde el transductor todavía está orientado en línea normal respecto al soporte plano. En función de los otros componentes ópticos del instrumento óptico, esta disposición se puede utilizar con un mayor abanico de frecuencias en comparación con un formato con divisor de luz y se pueden utilizar colorantes fluorescentes diferentes sin cambiar de instrumento óptico.

En función de la utilización y los parámetros del componente óptico utilizado, resultan apropiados diferentes ángulos de incidencia para el haz de luz de excitación. En el caso de una estructura de múltiples puntos individuales que no posean casi profundidad, el ángulo de incidencia puede ser de hasta 40° , dado que no se producen sombras que puedan ocultar la excitación de una parte de los colorantes fluorescentes. Un ejemplo de dicha estructura de múltiples puntos individuales es una matriz de manchas habilitadas sobre un soporte sólido plano.

En el caso de p. ej. una placa de microtitulación o cualquier otro soporte con una determinada estructura tridimensional, la situación respecto al ángulo de incidencia es diferente (véase la Figura 4). Con un ángulo de incidencia creciente, la topografía del soporte puede provocar la aparición de más y más sombras. Sobre todo en el caso de los pocillos de una placa de microtitulación, un ángulo de incidencia grande provoca que solo se ilumine una fracción del interior del pocillo. Por consiguiente, los ángulos de incidencia inferiores a 20° son apropiados para las placas de microtitulación.

En una realización preferida del instrumento óptico de acuerdo con la invención, el ángulo de incidencia α de la luz de excitación (16) es inferior a 20° , preferiblemente inferior a 10° y aún más preferible inferior a 5° .

Por otro lado, cabe destacar que el ángulo de incidencia α está limitado a valores más pequeños porque la apertura finita de los elementos ópticos de excitación y emisión es superior a cero.

En otra realización preferida del instrumento óptico de acuerdo con la invención, el ángulo de incidencia α es el siguiente:

$$\alpha \geq A_1 + A_2,$$

en el que A_1 es el semiángulo de apertura del elemento óptico de excitación y A_2 es el semiángulo de apertura del elemento óptico de emisión.

El semiángulo de apertura A_i del elemento óptico de excitación y del elemento óptico de proyección se define por la correspondiente apertura numérica NA_i como: $NA_i = n_i \sin A_i$, donde n_i es el índice de refracción del medio situado entre el objeto y el elemento óptico respectivo y donde $i = 1$ representa el elemento óptico de excitación e $i = 2$ representa el elemento óptico de proyección. Si el ángulo de incidencia α resulta más pequeño que lo definido por la ecuación anterior, una cantidad creciente de la reflexión del haz de luz de excitación incide en el transductor, tal como se demuestra en la Figura 4. Esta afirmación es cierta para una matriz de puntos habilitados sobre un soporte sólido plano así como para una placa de microtitulación.

En otra variante preferida, el instrumento óptico de acuerdo con la invención también comprende un sistema de filtros de excitación (8) capaz de transferir al menos una frecuencia de excitación desde dicha fuente lumínica hasta dicha estructura de múltiples puntos individuales, a la vez que bloquea un gran número de otras frecuencias.

Dicho sistema adicional de filtros de excitación permite bloquear determinadas frecuencias de la fuente lumínica que puedan ser problemáticas para los colorantes fluorescentes. Un sistema apropiado de filtros de excitación es la denominada rueda de filtros que consta de un determinado número de filtros individuales con propiedades ópticas diferentes. Dicha rueda de filtros proporciona un sistema simple de cambio de las frecuencias de excitación. Un sistema especial de filtros de excitación es, p. ej., un filtro que adsorbe las frecuencias infrarrojas (IR) o la luz ultravioleta (UV).

ES 2 285 578 T3

Dicho sistema de filtros de excitación especial puede conseguirse como un componente óptico separado, como un filtro en forma de película fina o en forma de un recubrimiento óptico activo sobre otros componentes ópticos del aparato.

5 En una realización más preferida, el instrumento óptico de acuerdo con la invención consta además de un sistema de filtros de emisión (9) capaz de transferir las señales de fluorescencia (17) de dicha estructura de múltiples puntos individuales a dicho transductor, a la vez que bloquea la luz con las frecuencias de excitación.

10 Dicho sistema adicional de filtros de emisión puede bloquear determinadas frecuencias generadas en los múltiples puntos individuales o procedentes de la reflexión de excitación que pueden resultar problemáticas para el proceso de emisión. Nuevamente, un sistema apropiado de filtros de emisión es una rueda de filtros que contiene distintos filtros. De forma análoga al sistema de filtros de excitación, un sistema especial de filtros de emisión puede ser por ejemplo un filtro de infrarrojos (IR) o un filtro de ultravioletas (UV). Los sistemas especiales de filtros de emisión se pueden presentar en forma de componente óptico separado, como un filtro en forma de película fina, o en forma de recubrimiento óptico activo sobre otros componentes ópticos del aparato. Otro sistema de filtros de emisión es un sistema de filtros que evita la detección de luz dispersa por el detector.

Como se ha mencionado anteriormente, el instrumento óptico de acuerdo con la invención comprende una disposición de lentes de excitación (10) que transfiere luz de dicha fuente lumínica (4) a dicha lente de campo (6).

20 Este hecho implica que la luz procedente de la fuente lumínica incide sobre la estructura de múltiples puntos individuales gracias a un elemento óptico de excitación que comprende la lente de campo (6) y una disposición de lentes de excitación (10). Dicho elemento óptico de excitación proporciona una luz de excitación telecéntrica en la cara correspondiente al objeto de la lente de campo (6) y, por tanto, es un elemento óptico de excitación telecéntrico. La disposición de lentes de excitación consta de al menos una lente, preferiblemente al menos tres lentes, para incrementar la apertura de la excitación y así mejorar la utilización de la energía de la fuente lumínica. La disposición de lentes de excitación puede constar de una lente esférica si es preciso disminuir la cantidad de lentes. Preferiblemente, el elemento óptico de excitación telecéntrico se diseña para que sea acromático para conseguir una distribución homogénea de la intensidad a lo largo de la estructura de múltiples puntos individuales independientemente de la longitud de onda de excitación.

30 En otra realización de la invención, dicha fuente lumínica emite luz que comprende un gran número de frecuencias, preferiblemente dicha fuente lumínica es de luz blanca, más preferiblemente dicha fuente lumínica es una lámpara de descarga como una lámpara de xenón o de mercurio o una lámpara de incandescencia, como una lámpara de tungsteno.

35 En otra realización de la invención, dicha fuente lumínica emite luz de una única frecuencia, preferiblemente dicha fuente lumínica es un láser, más preferiblemente dicha fuente lumínica es un LED.

40 La utilización de una fuente lumínica que emite con diferentes frecuencias presenta la ventaja que dicha fuente lumínica puede ser utilizada para distintos colorantes fluorescentes cambiando únicamente el sistema de filtros de excitación o el sistema de filtros de emisión. Es preferible utilizar ruedas de filtros como sistema de filtros de excitación o sistema de filtros de emisión que contengan una cantidad determinada de filtros para cambiar fácilmente de un colorante fluorescente a otro. Por otro lado, si la fuente lumínica emite luz con una única frecuencia, los requerimientos del juego de filtros se pueden cumplir con facilidad, pero el instrumento óptico quedará configurado para una cantidad limitada de colorantes fluorescentes.

45 En una realización de la invención, la ventana de la fuente lumínica posee un recubrimiento óptico activo que actúa como un sistema especial de filtros de excitación para adsorber la luz IR o UV.

50 En otra variante preferida de la invención, dicha fuente lumínica consta de una combinación de más de un iluminante, preferiblemente más de un láser, más preferiblemente más de un LED.

55 En esta realización preferida se utiliza un montaje de distintos iluminantes para obtener un instrumento óptico de acuerdo con la invención con más de una frecuencia de excitación. En dicha realización con, p. ej., dos fuentes de luz diferentes de acuerdo con la invención, cada fuente lumínica posee preferiblemente su propio sistema de filtros de excitación (8) y su propia disposición de lentes de excitación (10).

En otra variante de acuerdo con la invención, dicha fuente lumínica también comprende un dispositivo para seleccionar uno o varios de dichos iluminantes.

60 Se puede conseguir un dispositivo para seleccionar dichos iluminantes de varias formas. Una posibilidad es utilizar espejos móviles para dirigir la luz de un iluminante seleccionado hacia la trayectoria óptica. Otra posibilidad consiste en cambiar la disposición de los iluminantes para dirigir la luz de un iluminante seleccionado hacia la trayectoria óptica.

65 El elemento óptico de excitación telecéntrico de acuerdo con la invención puede constar de varios componentes adicionales además de la lente de campo (6), el sistema de filtros de excitación (8) y la disposición de lentes de excitación (10). En una realización el elemento óptico de excitación telecéntrico consta de una guía de luz (14) a la que se acopla la luz de la fuente lumínica para transferir la luz de dicha fuente a los componentes ópticos del sistema

5 óptico. Mediante una guía de luz es posible acoplar luz de diferentes fuentes de luz y transferir simultáneamente dicha luz combinada a los componentes ópticos. Para los objetivos de la presente invención se pueden utilizar todo tipo de guías de luz. Entre las posibles guías de luz se encuentran por ejemplo guías de luz líquidas, guías de luz de fibra óptica o mazos de guías de fibra óptica. En una realización de la invención, un extremo o ambos extremos de dicha
5 guía de luz tienen un recubrimiento óptico activo que actúa como un sistema de filtros de excitación especial para adsorber luz IR o UV.

Si resulta necesario, el elemento óptico de excitación telecéntrico puede constar de un espejo adicional (7) para
10 alterar la dirección de la luz de excitación. Dicho espejo (7) se ilustra en la realización de la Figura 1.

En otra realización de acuerdo con la invención, el elemento óptico de excitación telecéntrico además compren-
de un mezclador de luz (15) para mezclar luz de dicha fuente lumínica y reflejar la superficie iluminada de dicho
mezclador de luz (15) sobre la estructura de múltiples puntos individuales.

15 Un mezclador de luz (15) es un dispositivo con una superficie iluminada de forma muy homogénea que se puede utilizar como fuente lumínica que proporcione luz con una distribución homogénea de la intensidad a lo largo de toda su sección. Un mezclador de luz es un elemento más o menos alargado hecho de material óptico transparente, en el que los bordes de dicho elemento son paralelos a la trayectoria óptica. Es decir, un mezclador de luz es un tipo de fibra óptica. La luz que se inyecta dentro de dicho mezclador de luz experimenta reflexiones múltiples totales en la cara interna del material óptico transparente que produce un área transversal en uno de los extremos de la fibra que se encuentra iluminado de forma muy homogénea. El total de reflexiones que se producen en la cara interna del material óptico transparente se basa simplemente en el cambio del índice de refracción en dicha interficie o puede producirse por recubrimientos reflectantes. La relación de longitud de dicho mezclador de luz con su área transversal es importante para la homogeneidad de la iluminación. Dicha relación es preferiblemente superior a 2.

25 La luz de la fuente lumínica, particular del área transversal en un extremo del mezclador de luz se refleja sobre la estructura de múltiples puntos individuales utilizando el elemento óptico de excitación telecéntrico que consta de la lente de campo (6) y la disposición de lentes de excitación (10). Por tanto, en esta realización de la invención la excitación de los múltiples puntos individuales se realiza con un elemento óptico de excitación que es telecéntrico respecto al espacio del objeto.

El instrumento óptico de acuerdo con la invención se puede adaptar también a la visualización de quimiolumi-
niscencia y bioluminiscencia. Dado que en esos casos no se necesita luz de excitación, la fuente lumínica (4), la
35 disposición de lentes de excitación (10) y el sistema de filtros de excitación (8) se pueden omitir.

En una variante aún más preferida, el instrumento óptico de acuerdo con la invención además comprende una
unidad reflectora del haz de luz (11) que contiene uno, dos o más espejos reflectores, dicha unidad reflectora desvía la
luz de dicha fuente lumínica y las señales de fluorescencia (17) de dicha estructura de múltiples puntos individuales.

40 Dentro del ámbito de la invención, una unidad reflectora del haz de luz es una unidad que proporciona una trayecto-
ria óptica larga, mientras que al mismo tiempo solo necesita una cantidad de espacio reducida. Esto puede conseguirse
mediante la colocación de dos espejos reflectores tal como se ilustra en las Figuras 1 y 2. Para limitar al máximo el ángulo de los rayos principales cerca del diafragma de apertura, un parámetro que puede ser modificado es la trayectoria óptica que la luz debe recorrer. Al alargar la trayectoria óptica también se reducen los ángulos máximos de los rayos principales en el sistema de filtros de excitación (8), dado que se encuentra cerca del diafragma de apertura. Dado que la colocación del sistema de filtros de excitación (8) se ve afectada, si los ángulos de los rayos principales se hacen muy grandes, la trayectoria óptica debe ser bastante larga. Como la utilización de instrumentos grandes no es útil, se pueden utilizar espejos reflectores para conseguir una trayectoria óptica extensa y a la vez reducir el tamaño del instrumento.

50 Tal como se ha mencionado anteriormente, el instrumento óptico de acuerdo con la invención comprende una
disposición de lentes de emisión (12) que transfiere luz desde dicha lente de campo (6) a dicho transductor (5).

Este hecho implica que las señales de fluorescencia (17) generadas en la estructura de múltiples puntos individuales
se proyectan en un transductor (5) mediante un elemento óptico de emisión telecéntrico que consta de la lente de campo
55 (6) y la disposición de lentes de emisión (12). En otras realizaciones de la invención, el elemento óptico de emisión telecéntrico también comprende, p. ej., una unidad reflectora del haz de luz (11) o sistemas especiales de filtros de emisión (9).

El elemento óptico de emisión telecéntrico se ha de optimizar respecto al tamaño del transductor y con el mismo
60 volumen espacial que la estructura de múltiples puntos individuales. Como en el caso de la disposición de lentes de
excitación (10), la disposición de lentes de emisión (12) comprende al menos una lente, preferiblemente un sistema
de al menos 5 lentes. Para la disposición de las lentes de emisión se hace necesario un gran número de lentes, dado
que el elemento óptico de emisión debe cumplir una mayor cantidad de requisitos en comparación con el elemento
65 óptico de excitación. La emisión de la fluorescencia debe presentar la escala apropiada para reproducir correctamente
la distribución lateral de puntos en el transductor. Asimismo, se deben controlar los errores de emisión como las
aberraciones cromáticas y esféricas, la coma, el astigmatismo, los errores especiales y la curvatura de campo. Gracias
a la proyección de las señales fluorescentes en el transductor, la emisión de la fluorescencia se lleva a cabo con un
elemento óptico de emisión que es telecéntrico únicamente en la cara del objeto de la lente de campo (6).

ES 2 285 578 T3

En una variante más preferida del instrumento óptico de acuerdo con la presente invención, dicha disposición de lentes de emisión (12) se acopla con dicho transductor (5) formando una unidad de emisión (13).

5 Cabe destacar que en esta realización preferida de la presente invención, el elemento óptico de emisión telecéntrico es diferente a los objetivos estándar, en los que todas las lentes se disponen y se fijan de una forma definida formando el objetivo, y dicho objetivo se coloca como un elemento único entre el transductor y el objeto. Por el contrario, en esta realización preferida de la presente invención, la disposición de lentes de emisión (12) se acopla al transductor (5) formando una unidad de emisión (13). Para cumplir todos los requisitos de resolución y precisión de la imagen, la colocación de la disposición de lentes de emisión y del transductor es de especial importancia. En esta realización 10 estos requisitos se cumplen optimizando la posición entre la disposición de lentes de emisión y el transductor antes de fijar la posición optimizada. Dicho acoplamiento entre la disposición de lentes de emisión y el transductor se mantiene durante toda la utilización prevista y únicamente se libera si resulta necesaria una reoptimización de la colocación.

15 En una realización del instrumento óptico de acuerdo con la invención, dicho transductor comprende un dispositivo semiconductor o preferiblemente un dispositivo de cargas interconectadas.

En el contexto de esta invención, un transductor es un dispositivo capaz de transformar luz en señales eléctricas que pueden ser procesadas por un ordenador. Esto se puede realizar con dispositivos semiconductores que posean una banda prohibida más pequeña que la energía correspondiente a las señales fluorescentes que se han de detectar. Los 20 electrones generados en la banda conductora del semiconductor mediante la iluminación del dispositivo producen una señal que puede ser medida y traducida a datos computables. Son ejemplo de estos dispositivos semiconductores los fotodiodos y los dispositivos de cargas interconectadas (CCD, siglas en inglés).

25 Una variante más preferida del instrumento óptico de acuerdo con la invención es un instrumento óptico en el que los puntos individuales de dicha estructura son pocillos, la luz de excitación (16) tiene un ángulo inferior a 20° en relación con las paredes laterales de dichos pocillos y la solución que llena dichos pocillos comprende colorantes fluorescentes.

30 Un ejemplo de esta variante más preferida del instrumento óptico es un dispositivo para controlar de forma simultánea la amplificación por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) que tiene lugar en los pocillos individuales de una placa de microtitulación. La luz de excitación tiene un ángulo inferior a 20° respecto a las paredes laterales de los pocillos para iluminar gran parte del interior de los pocillos independientemente de la altura de llenado del interior de los pocillos. Dado que se utiliza un elemento óptico telecéntrico tanto para excitar como para emitir las imágenes de fluorescencia, los resultados de un pocillo situado en el centro de la placa son comparables al de aquellos pocillos 35 situados en los bordes de la placa.

En el caso de amplificaciones por PCR llevadas a cabo en pocillos individuales, todos los elementos fluorescentes se pueden utilizar como colorantes fluorescentes que se unen específicamente a ácidos nucleicos bicatenarios. En el contexto de esta invención estos colorantes fluorescentes se denominan elementos fluorescentes de unión a DNA, 40 donde el elemento fluorescente de unión a DNA es una molécula o un par de moléculas que proporcionan una luz fluorescente característica si se unen a DNA bicatenario. En el ámbito del control de la PCR a tiempo real, se conocen los siguientes sistemas de detección: colorantes de unión a DNA (p. ej., SybrGreen I), sondas TaqMan, balizas moleculares, sondas con marcador único (SLP, siglas en inglés) y sondas de hibridación de FRET.

45 Una realización también preferida del instrumento óptico de acuerdo con la invención es un instrumento óptico en el que los puntos individuales de dichas estructuras son manchas en un soporte plano y los colorantes fluorescentes se unen a dichas manchas.

50 Un ejemplo de esta realización preferida del instrumento óptico es un dispositivo para visualizar de forma simultánea las señales fluorescentes de diferentes puntos de una matriz plana. En una realización específica dicha matriz es un chip de DNA donde las áreas laterales delimitadas están habilitadas con sondas de DNA de diferente secuencia. En este caso, el instrumento óptico de acuerdo con la invención puede controlar los acontecimientos de hibridación en muestras que contienen ácidos nucleicos, si p. ej. la hebra complementaria de DNA se marca con un colorante fluorescente. Como alternativa al marcaje de moléculas de DNA de la muestra, los acontecimientos de hibridación 55 también se pueden visualizar mediante colorantes fluorescentes de unión a ácidos nucleicos bicatenarios.

La invención también se refiere a un instrumento para PCR a tiempo real que comprende los siguientes elementos:

60 - un instrumento óptico de acuerdo con la invención y

- un sistema para calentar y enfriar un soporte con uno o más pocillos que contienen cada uno una mezcla de reacción capaz de llevar a cabo una reacción de PCR.

65 Dentro del ámbito de esta invención, el sistema para calentar y enfriar incluye cualquier medio capaz de controlar y alterar la temperatura de la estructura de múltiples puntos individuales de forma cíclica para realizar una amplificación cíclica por PCR de ácidos nucleicos. Cada ciclo de PCR consta de varias fases diferentes: una fase de hibridación con una disminución de temperatura, una fase de amplificación enzimática a temperaturas relativamente bajas junto con una fase de detección utilizando un colorante fluorescente y una fase de desnaturalización a temperaturas elevadas.

ES 2 285 578 T3

Otro aspecto de la invención se refiere a un sistema para realizar y controlar un gran número de reacciones de PCR simultáneas a tiempo real que conste de:

5 - una placa con múltiples pocillos con un gran número de puntos individuales que contienen cada uno una mezcla de reacción capaz de llevar a cabo una reacción de PCR,

- una molécula fluorescente de unión al DNA y

10 - un instrumento para PCR a tiempo real de acuerdo con la invención que comprende un instrumento óptico de acuerdo con la invención para iluminar totalmente la placa de múltiples pocillos con luz telecéntrica y detectar las señales de fluorescencia de cada pocillo de dicha placa con un transductor colocado de manera que recibe las señales de fluorescencia correspondientes para producir datos primarios computables.

15 En general, existen diferentes formatos de elementos fluorescentes de unión a DNA para la detección a tiempo real de DNA amplificado, entre los que se encuentran los siguientes, ampliamente conocidos y utilizados habitualmente en el campo:

a) *Formato de colorantes de unión a DNA*

20 Dado que la cantidad de producto de amplificación bicatenario normalmente es mayor que la cantidad de ácido nucleico que hay originariamente en la muestra a analizar, se pueden emplear colorantes específicos para DNA bicatenario que al ser excitados con una longitud de onda adecuada muestran una fluorescencia aumentada, pero solamente si están unidos a DNA bicatenario. Preferiblemente, solo se deben utilizar los colorantes que no interfieran en la eficiencia de la reacción de PCR, como por ejemplo el SybGreen I.

25 El resto de formatos conocidos en el ámbito requieren el diseño de una sonda de hibridación marcada con fluorescencia que solamente emita fluorescencia cuando se encuentra unida a su ácido nucleico diana.

b) *Sonda TaqMan*

30 Se marca una sonda de hibridación de cadena única con dos componentes. Cuando se excita el primer componente con luz de una longitud de onda determinada, la energía absorbida se transfiere al segundo componente, el denominado amortiguador, de acuerdo con el principio de fluorescencia por transferencia de energía resonante. Durante la etapa de hibridación de la reacción de PCR, la sonda de hibridación se une al DNA diana y es degradada por la actividad exonucleasa 5'-3' de la Taq polimerasa durante la fase de elongación que le sigue. Como resultado de esto, el componente fluorescente excitado y el amortiguador presentan un espacio de separación entre sí de modo que es posible medir una emisión de fluorescencia del primer componente (US 5 538 848).

c) *Balizas moleculares*

40 Estas sondas de hibridación también están marcadas con un primer componente y con un amortiguador, encontrándose los marcadores preferiblemente en ambos lados de la sonda. Debido a la estructura secundaria de la sonda, ambos componentes se encuentran muy próximos cuando están en solución. Tras la hibridación con los ácidos nucleicos diana, los dos componentes se separan entre sí de tal modo que cuando se excitan con luz de una longitud de onda adecuada se puede medir la emisión de fluorescencia del primer componente (US 5 118 801).

d) *Formato de sondas con marcador único*

45 Este formato de detección consiste en un oligonucleótido individual marcado con un único colorante fluorescente en cualquiera de los dos extremos 5' o 3' (WO 02/14555). Para el marcaje de oligonucleótidos se pueden utilizar dos diseños diferentes: sondas amortiguadoras por guanosina (*G-Quenching Probes*) y sondas "desamortiguadoras" de nitroindol (*Nitroindole-Dequenching probes*).

50 En la manera de realizar la amortiguación por guanosina el colorante fluorescente está unido a una C en el extremo 5'- o 3'- del oligonucleótido. La fluorescencia desciende de forma significativa cuando la sonda está hibridada con la diana, siempre y cuando haya dos G de la cadena diana en situación opuesta a la C marcada y situados en el lugar del primer nucleótido adyacente al último que hibrida con la sonda oligonucleotídica complementaria.

55 En la manera de realizar la "desamortiguación" por nitroindol, el colorante fluorescente está unido a nitroindol en el extremo 5'- o 3'- del oligonucleótido. El nitroindol provoca de algún modo la disminución de la señal de fluorescencia de la sonda libre. La fluorescencia aumenta cuando la sonda está hibridada con el DNA diana debido a un efecto "desamortiguador".

e) *Sondas de hibridación de FRET*

60 El formato del análisis por sondas de hibridación de FRET tiene una utilidad especial para todo tipo de ensayos de hibridación homogénea (Matthews, J.A., y Kricka, L.J., Anal. Biochem. 169 (1988) 1-25. Está caracterizado por un par de sondas de hibridación de cadena única que se emplean de forma simultánea y son complementarias a sitios adyacentes de la misma cadena del ácido nucleico diana amplificado. Las dos sondas están marcadas con componentes fluorescentes diferentes. Cuando son excitadas con luz de una longitud de onda adecuada, un primer componente

ES 2 285 578 T3

transfiere la energía absorbida a un segundo componente de acuerdo con el principio de fluorescencia por transferencia de energía resonante de manera que es posible medir una emisión de fluorescencia del segundo componente cuando las dos sondas de hibridación se unen a posiciones adyacentes de la molécula diana a detectar.

5 Cuando se hibridan con la secuencia diana, las sondas de hibridación deben encontrarse muy próximas entre sí y dispuestas una seguida de la otra. Normalmente, el espacio situado entre el extremo 3' marcado de la primera sonda y el extremo 5' marcado de la segunda sonda debe ser lo más pequeño posible, es decir, de 1 a 5 bases. Esto permite que exista una gran proximidad entre el compuesto donante de FRET y el compuesto aceptor de FRET, que normalmente es de 10 a 100 Å.

10 Otra opción alternativa al seguimiento del aumento de fluorescencia del componente aceptor de FRET consiste en controlar el descenso de fluorescencia del componente donante de FRET como medición cuantitativa de sucesos de hibridación.

15 En concreto, el formato de sonda de hibridación de FRET puede emplearse en PCR a tiempo real con la finalidad de detectar el DNA diana amplificado. Entre todos los formatos de detección conocidos en el campo de la PCR a tiempo real, el formato de las sondas FRET de hibridación ha demostrado ser marcadamente sensible, exacto y fiable (WO 97/46707; WO 97/46712; WO 97/46714). Aun así, el diseño de secuencias de sondas de hibridación de FRET apropiadas en ocasiones puede estar limitado por las características especiales de la secuencia del ácido nucleico diana que se pretende detectar.

20 Como alternativa al uso de dos sondas de hibridación de FRET, también es posible emplear un cebador marcado con fluorescencia y solamente una sonda oligonucleotídica marcada (Bernard, P. S., *et al.*, Anal. Biochem. 255 (1998) 101-107). A este respecto, se puede escoger de forma arbitraria si el cebador se marca con el compuesto donante de FRET o el aceptor de FRET.

25 La invención está también relacionada con un método de amplificación, detección o cuantificación de múltiples secuencias de DNA diana, que comprende los siguientes pasos:

- 30 - proporcionar una composición o mezcla de reacción capaz de llevar a cabo una reacción de PCR,
- someter dicha mezcla de reacción a un protocolo de termociclado de manera que pueda producirse la amplificación de dichas múltiples secuencias diana de DNA y
- 35 - controlar la presencia y la cantidad de cada secuencia de DNA al menos una vez después una serie de ciclos de amplificación utilizando moléculas fluorescentes de unión al DNA y un instrumento para PCR a tiempo real de acuerdo con la invención.

Ejemplos

40 Los siguientes ejemplos se llevaron a cabo con un aparato óptico como el que se ha explicado en la descripción detallada y como el que se representa en la figura 3. El elemento óptico de excitación telecéntrica se ajustó para manejar frecuencias de 500 a 740 nm. La fuente de luz era una lámpara de xenón y el transductor un chip CCD enfriado de 2/3" con 1024 x 1344 píxeles. El instrumento óptico se diseñó para visualizar un área de 83 mm x 117 mm de modo que es posible utilizar placas de microtitulación (MTP, siglas en inglés) con 96 pocillos (9 mm de distancia; 5 mm de diámetro) o con 384 (4,5 mm de distancia; 3 mm de diámetro). La longitud de onda adecuada para la excitación y emisión de determinados colorantes fluorescentes se ajustó mediante ruedas de filtros.

45 El elemento óptico de excitación telecéntrica presentaba una apertura numérica en la cara de la fuente de luz de 0,35 y en la cara de la MTP de 0,014. Debido a razones de geometría la fuente de luz se dispuso perpendicular al chip CCD y el haz de luz de excitación se tuvo que orientar hacia la MTP con un espejo adicional. El propio haz de luz de excitación presentaba un ángulo de incidencia respecto de la MTP de 2° y una variación de intensidad a lo largo del campo objeto (88 mm x 122 mm) menor del 10%. El elemento óptico de emisión presentaba también una apertura en la cara del objeto de 0,014 y una escala de reproducción de -0,075 con una distancia entre objeto e imagen de 800 mm. Esta gran distancia se consiguió con dos espejos reflectores. El elemento óptico de proyección tenía una profundidad de campo aproximada de 3 mm.

Ejemplo 1

Sensibilidad y reproducibilidad

50 La sensibilidad de un instrumento óptico como el que se ha explicado anteriormente se investigó con series de dilución empleando fluoresceína-sodio en agua. Se realizaron ensayos con tres tipos diferentes de MTP [una MTP negra (MTP 1), una MTP transparente (MTP 2) y una MTP blanca (MTP 3)] que proporcionaban más o menos la misma sensibilidad. Las mediciones se realizaron a 58°C con un tiempo de integración de 1000 ms y se repitieron 50 veces para cada uno de los puntos del diagrama de la figura 5.

65 Las 50 mediciones mencionadas sirvieron también para analizar la reproducibilidad del instrumento óptico. La progresión de la intensidad se ilustra en la figura 6 con el ejemplo de una MTP negra para dos instrumentos ópticos

ES 2 285 578 T3

diferentes. A partir del valor 20 al 50 para una concentración de fluoresceína-sodio en agua de 85 nmol/l en cuatro pocillos diferentes y con dos tipos de MTP y dos instrumentos ópticos diferentes se obtuvieron las siguientes variaciones: 0,25% para MTP 1 y 0,39% para MTP 2. En el caso de la MTP blanca se hizo lo mismo con una concentración de 21 nmol/l y se obtuvo una variación de 0,98%.

5

Ejemplo 2

Interferencias

10 En la figura 7 se muestra una imagen de una MTP transparente con fluoresceína-sodio en 5 pocillos. La imagen de la MTP muestra dos tipos de señales de los pocillos fluorescentes. El primer tipo de señal se detectó dentro del radio de distancia a los pocillos vecinos, tenía el mismo diámetro que el propio pocillo y una intensidad de cerca del 0,5% de la del pocillo. La segunda señal tenía un diámetro de aproximadamente 2 o 3 veces el diámetro del propio pocillo con fluoresceína-sodio y una intensidad reducida en un factor de 2×10^4 - 3×10^4 .

15 En resumen, la intensidad media en los pocillos vecinos se reduce en un factor de 3×10^4 en el caso de la MTP negra y en un factor de 1×10^3 tanto en el de la MTP blanca como en el de la transparente.

Ejemplo 3

Nivel de llenado

20 Este ejemplo se realizó para evaluar el grado de dependencia de las señales de fluorescencia del nivel de llenado de los pocillos. Los resultados se ilustran en la figura 8. Se pipetearon en los pocillos cantidades diferentes de una solución con fluoresceína sodio a una concentración de 169 nmol/l. La figura 8 muestra las intensidades medias de 10 pocillos diferentes. Tal como se espera de una emisión que es independiente del nivel de llenado de los pocillos, se encontró una dependencia lineal entre la intensidad de fluorescencia y el volumen aplicado de concentración constante.

Referencias

- 30 **Bernard, P. S., et al.,** *Anal. Biochem.* 255 (1998) 101-107
DE 101 31 687
DE 101 55 142
35 DE 102 00 499
DE 197 48 211 A1
EP 1 275 954 A2
40 JP 2002014044
Matthews, J. A. y Kricka, L. J., *Anal. Biochem.* 169 (1988) 1-25
45 US 2002/0005493 A1
US 2002/159057
US 2003/0011772 A1
50 US 5 118 801
US 5 538 848
US 6 246 525 B1
55 US 6 498 690 B1
WO 02/14555
60 WO 03/069391
WO 97/46707
WO 97/46712
65 WO 97/46714
WO 99/60381

REIVINDICACIONES

1. Un instrumento óptico para visualizar señales de fluorescencia de múltiples puntos individuales, que comprende:

- un sistema de sujeción (1) de un soporte plano (2) a una estructura de múltiples puntos individuales (3),
- al menos una fuente lumínica (4) para emitir luz que consta de al menos una frecuencia de excitación,

- un transductor (5) dispuesto de manera que reciba las señales de fluorescencia de dicho montaje de múltiples puntos individuales (3) y que se configura para producir datos primarios computables,

- una lente de campo (6) dispuesta de manera que transfiera la luz de excitación (16) de dicha fuente lumínica (4) a dicha estructura de múltiples puntos individuales (3) y transferir señales de fluorescencia (17) de dicha estructura de múltiples puntos individuales (3) a dicho transductor (5),

- una lente de excitación (10) colocada de forma que transfiera la luz de excitación (16) de dicha fuente lumínica (4) a dicha lente de campo (6), y

- una lente de emisión (12) colocada de forma que transfiera las señales de fluorescencia (17) de dicha lente de campo (6) a dicho transductor (5),

en el que dicha lente de campo (6) se dispone de forma que produzca luz de excitación (16) con un ángulo de incidencia α con dicho soporte plano (2) de dicha estructura de múltiples puntos individuales (3) que sea mayor de 0° y

en el que la trayectoria de la luz de excitación y la trayectoria de la luz fluorescente de emisión son telecéntricas en la cara de dicha lente de campo correspondiente al objeto.

2. Un instrumento óptico de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el ángulo de incidencia de la luz de excitación (16) es menor que 20° , preferiblemente menor que 10° y, más preferiblemente, menor que 5° .

3. Un instrumento óptico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 2, en el que el ángulo de incidencia α es

$$\alpha \geq A_1 + A_2,$$

donde A_1 es el semiángulo de apertura de la excitación y A_2 es el semiángulo de apertura de la emisión de la fluorescencia.

4. Un instrumento óptico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 3, en el que dicha disposición de lentes de emisión (12) está acoplada a dicho transductor (5) formando una unidad de emisión (13).

5. Un instrumento óptico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 4, que también comprende una unidad reflectora del haz de luz (11) que contiene uno, dos o más espejos reflectores, estando dicha unidad reflectora dispuesta para reflejar la luz procedente de dicha fuente de luz y las señales de fluorescencia procedentes de dicha estructura de múltiples puntos individuales.

6. Un instrumento óptico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 5, en el que los puntos individuales de dicha estructura son pocillos, la luz de excitación (16) tiene un ángulo inferior a 20° respecto a las paredes laterales de dichos pocillos y la solución con la que están llenos los pocillos contiene colorantes fluorescentes.

7. Un instrumento óptico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 5, en el que los puntos individuales de dicha estructura son puntos sobre un soporte plano a los que se encuentran unidos colorantes fluorescentes.

8. Un instrumento para PCR a tiempo real que contiene

- un instrumento óptico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 7;

- un sistema para calentar y enfriar un soporte con uno o varios pocillos que contienen cada uno una mezcla de reacción que permite realizar una reacción de PCR.

9. Un sistema para realizar y controlar una variedad de reacciones de PCR de forma simultánea y en tiempo real, que comprende lo siguiente:

- una placa con múltiples pocillos con un gran número de puntos individuales que contienen cada uno una mezcla de reacción capaz de llevar a cabo una reacción de PCR,

ES 2 285 578 T3

- elementos fluorescentes de unión al DNA,

- un instrumento para PCR a tiempo real de acuerdo con la reivindicación 8 que comprende un instrumento óptico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 7 para iluminar totalmente la placa con múltiples pocillos con luz telecéntrica y detectar las señales de fluorescencia de cada pocillo de dicha placa con un transductor colocado de manera que recibe las señales de fluorescencia correspondientes para producir datos primarios computables.

10. Un método para amplificar, detectar o cuantificar múltiples secuencias de DNA diana, que comprende lo siguiente:

- proporcionar una composición o mezcla de reacción capaz de llevar a cabo una reacción de PCR,

- someter dicha mezcla de reacción a un protocolo de termociclado de manera que pueda producirse la amplificación de dichas múltiples secuencias diana de DNA y

- controlar la presencia y la cantidad de cada secuencia de DNA al menos una vez después una serie de ciclos de amplificación utilizando moléculas fluorescentes de unión al DNA y un instrumento para PCR a tiempo real de acuerdo con la reivindicación 8.

Fig. 1

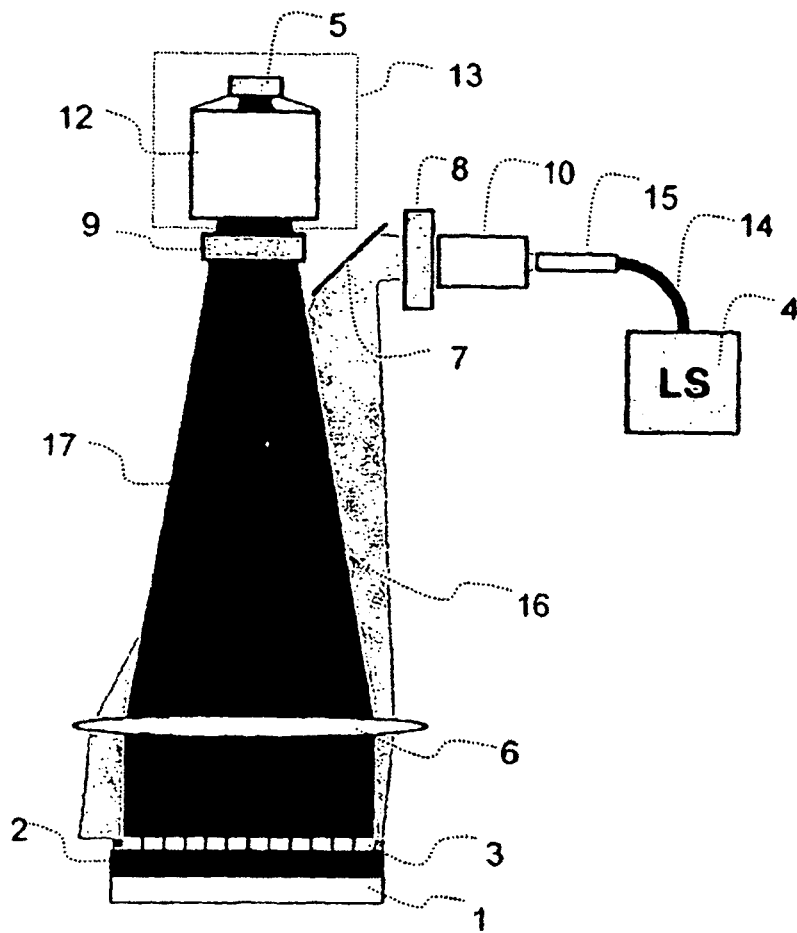


Fig. 2

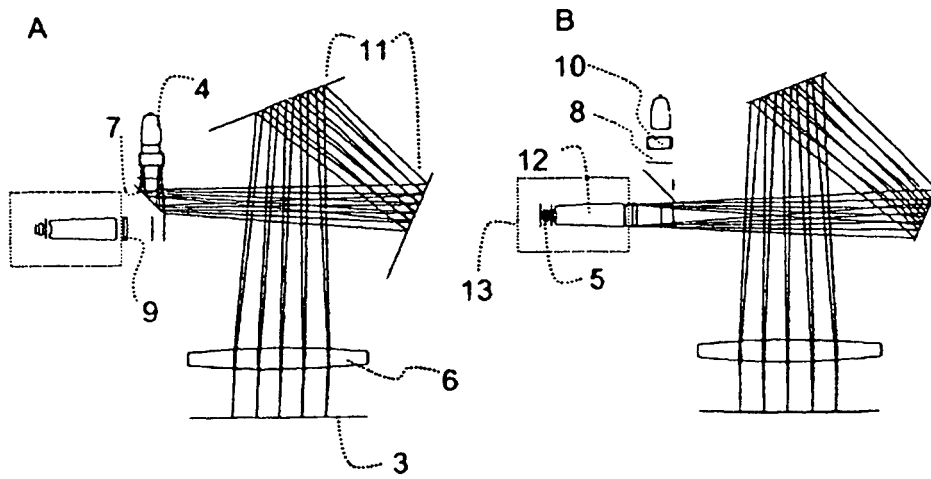


Fig. 3

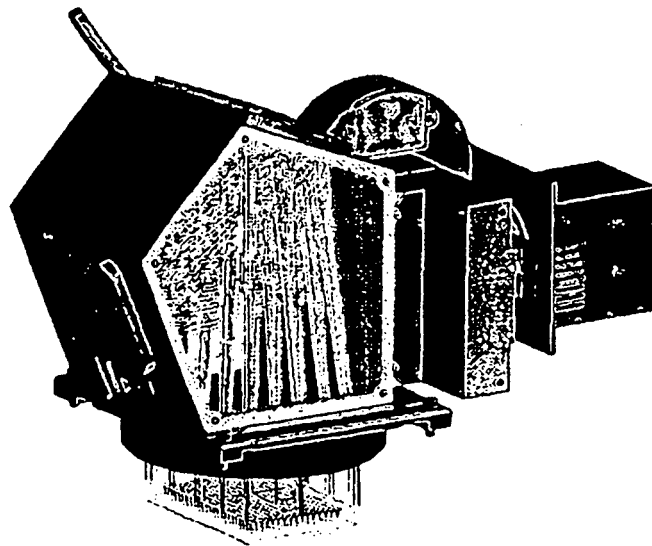


Fig 4

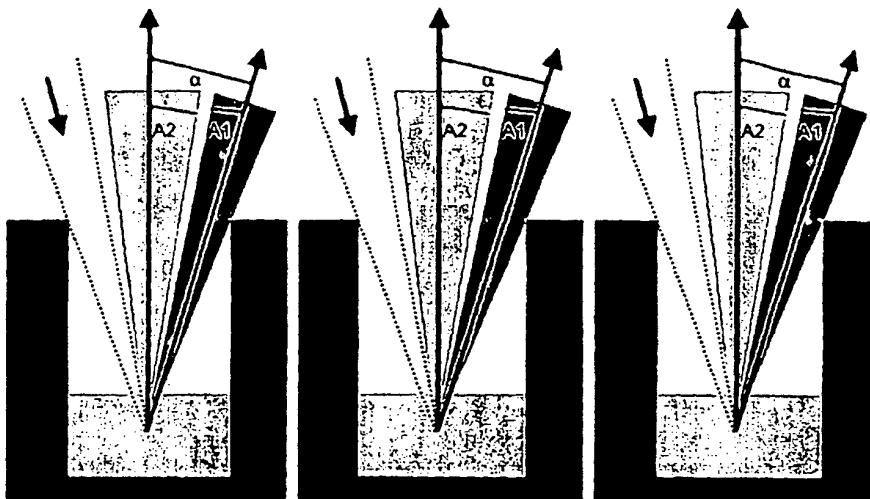


Fig. 5

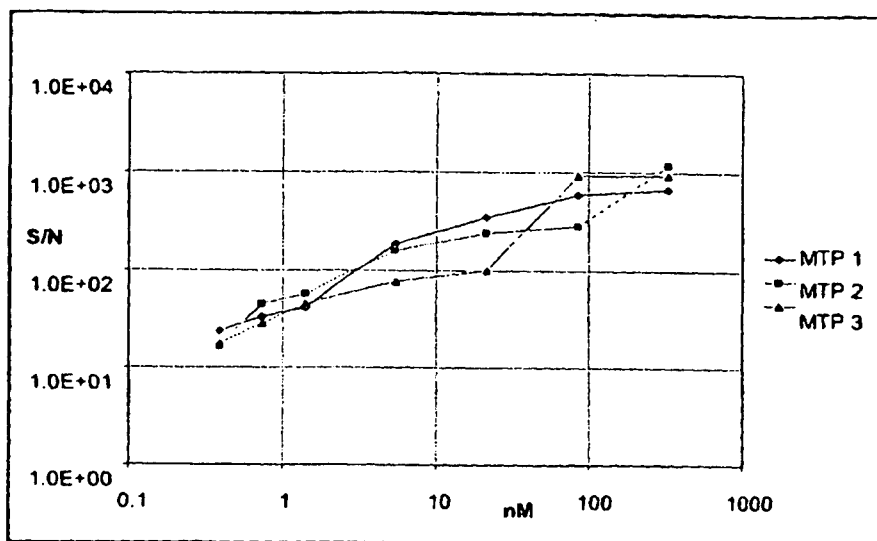


Fig. 6

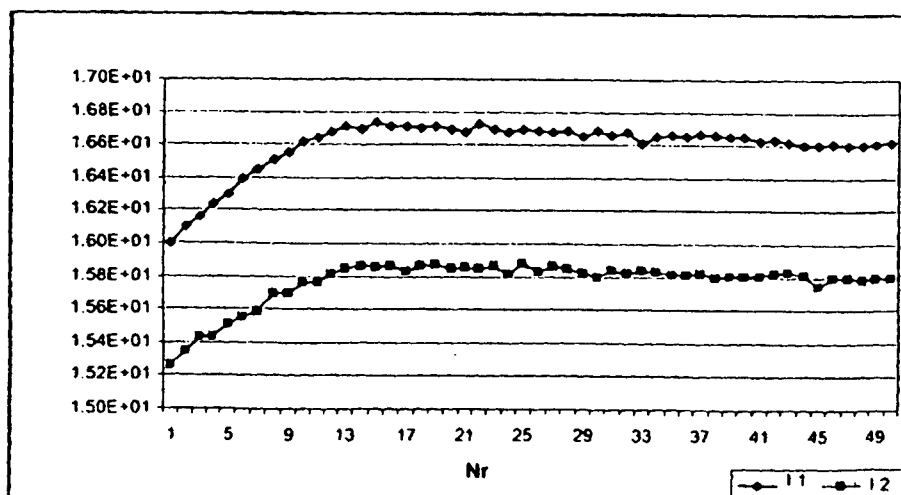


Fig. 7

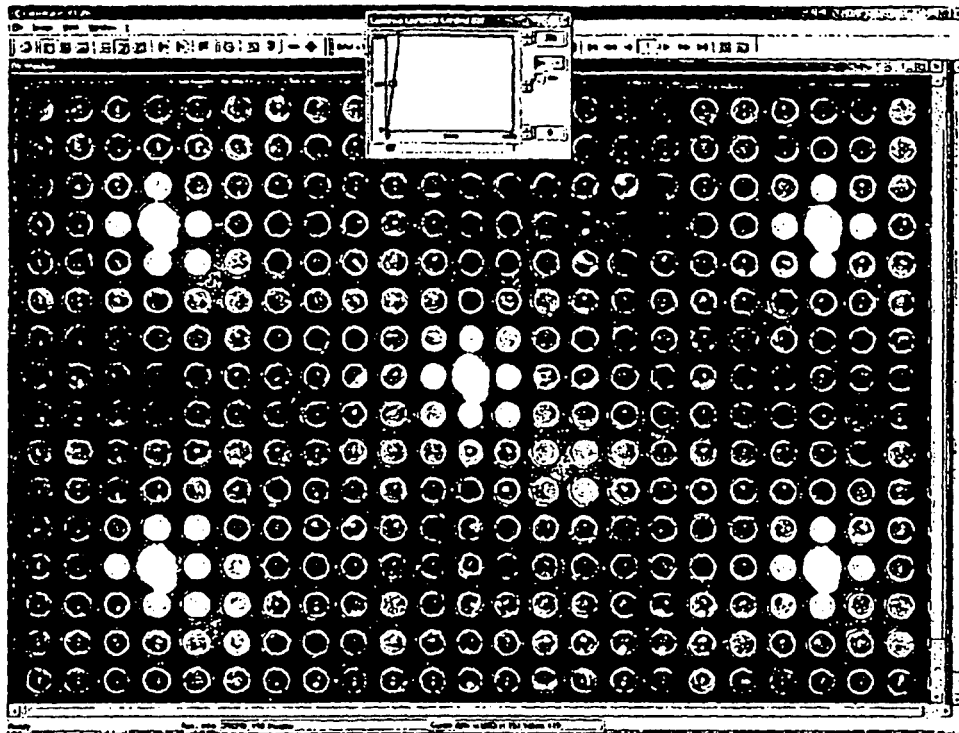


Fig. 8

