

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 876 194**

51 Int. Cl.:

C12M 1/00 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

C12Q 1/68 (2008.01)

B01L 3/00 (2006.01)

B01L 7/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.11.2017 PCT/JP2017/040453**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.06.2018 WO18105302**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.11.2017 E 17877829 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.05.2021 EP 3553157**

54 Título: **Dispositivo para reacción de amplificación de ácidos nucleicos**

30 Prioridad:

08.12.2016 JP 2016238677

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

12.11.2021

73 Titular/es:

MIZUHO MEDY CO., LTD. (100.0%)

5-4, Fujinoki-Chou

Tosu-shi, Saga 841-0048, JP

72 Inventor/es:

NARAHARA, KENJI;

NAGANO, TAKASHI y

MOTOMATSU, SHINYA

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 876 194 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

Dispositivo para reacción de amplificación de ácidos nucleicos

5 ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

1. Campo de la invención

10 La presente invención se refiere a un dispositivo usado para la amplificación de ácidos nucleicos para detectar y/o identificar la secuencia de bases del ácido nucleico diana.

Al utilizar el dispositivo usado para la amplificación de ácido nucleico con un aparato de medición simple, la presente invención se vuelve preferentemente aplicable en un sitio clínico en un modo de POCT.

15 La palabra "POCT" es una abreviatura para "Point of Care Testing (pruebas en el punto de atención)", lo que significa una prueba realizada cerca de un sujeto y/o realizada por el propio sujeto. La POCT posee el beneficio de: acortar el tiempo de prueba; y realización en el sitio clínico, que es una prueba que puede ser vista por el propio sujeto.

20 La POCT también se define como una prueba para mejorar la calidad de un cuidado médico rápido y adecuado, enfermería, prevención de enfermedades, atención médica, CdV (Calidad de vida), y el grado de satisfacción de la misma en la directiva POCT emitida por la sociedad japonesa para la automatización de laboratorios clínicos.

2. Descripción de la técnica relacionada

25 En los últimos años, el campo de las ciencias de la vida se ha desarrollado notablemente y se ha utilizado ampliamente la técnica para analizar ácido nucleico (tal como ADN, ARN o similares).

La técnica de análisis de ácidos nucleicos se utiliza para:

30 identificación de especies y/o estudio del origen en el campo biológico; diagnóstico de enfermedades en el campo médico; especificar el lugar de un producto agrícola; y/o juzgar la existencia de la recombinación de genes para la inocuidad y seguridad de alimentos en el campo próximo a la vida cotidiana, por ejemplo.

35 Con respecto al diagnóstico de enfermedades en el campo médico, en particular con respecto al diagnóstico rápido de enfermedades infecciosas, la técnica (en lo sucesivo en el presente documento, llamada "cribado genético") de amplificación y/o análisis (por medio de un método de PCR, un método para la amplificación isotérmica del ácido nucleico, o similares) de un ácido nucleico diana, tal como una secuencia genética característica de un gen extraño que no existe en uno mismo entre las técnicas de análisis de ácido nucleico tiene una excelente sensibilidad y especificidad en comparación con técnicas de diagnóstico de enfermedades infecciosas convencionales, tales como una prueba de cultivos, un examen inmunológico (una prueba que utiliza antígenos y/o anticuerpos).

40 De acuerdo con el cribado genético, es posible detectar y/o identificar casi todas las clases de microorganismos patógenos que provocan enfermedades infecciosas a los Homo sapiens, tales como bacterias, hongos, protozoos, virus, o similares.

45 Por esta razón, el cribado genético se utiliza habitualmente en instalaciones a gran escala ricas en personal, por ejemplo, hospitales de gran escala con salas de inspección dedicadas y/o laboratorios, institutos de salud e instalaciones de investigación de universidades y empresas.

50 Cada año se expande el mercado de reactivos de diagnóstico que utiliza el cribado genético. Se piensa que el cribado genético aumentará su importancia con respecto no solo al punto de vista del diagnóstico rápido de enfermedades infecciosas, sino también a otro punto de vista de actividades económicas.

55 Sin embargo, en la práctica, raramente se utiliza el cribado genético en instalaciones médicas donde la gente común tiende a acudir muchas veces, por ejemplo, hospitales privados familiares, clínicas, o similares.

60 Como una razón de lo anterior, puede alegarse que el cribado genético requiere una preparación y pretratamiento de antemano del ácido nucleico, que son muy complicados y llevan mucho tiempo.

Por este motivo, es difícil corresponder a la preparación y al pretratamiento simultáneamente con negocios distintos a los mismos. En las instalaciones pequeñas anteriores, la carga de trabajo que suponen estos es demasiado pesada y el trabajo del personal no puede limitarse al cribado genético. Puede aducirse dicho problema.

65 Como otra razón, los costes de la inversión inicial y los gastos administrativos y de mantenimiento son demasiado altos para estas instalaciones pequeñas anteriores. Para realizar el pretratamiento anterior del ácido nucleico, debe

suministrarse equipamiento físico y químico, tal como una máquina centrifugadora y una micropipeta, y también debe introducirse equipamiento de automatización para el cribado genético. Puede aducirse dicho problema.

5 Como una razón adicional, casi todos los miembros, tales como el personal médico y/o de enfermería dentro de tales instalaciones pequeñas no tienen suficiente experiencia en el cribado genético. Puede aducirse dicho problema.

10 Por el contrario, también en las instalaciones médicas pequeñas anteriores sin ninguna sala de inspección dedicada y/o laboratorio, los kits de pruebas correspondientes a las POCT basados en el examen inmunológico (por ejemplo, un método de anticuerpo marcado, un método de inmunonefelometría, un método de floculación en látex, un método de inmunocromatografía) son ampliamente utilizados para el diagnóstico de enfermedades infecciosas.

15 Por ejemplo, el Ministerio de Salud, Trabajo y Bienestar de Japón ha anunciado que la cantidad programada de personas a las que se les va a proporcionar kits de examen rápido con respecto a antígenos de la influenza (2015/2016) es de aproximadamente 27.950.000. Debido a esto, se sabe que ya se han extendido por todo Japón los kits POCT de examen rápido con respecto a antígenos de la influenza.

20 Sin embargo, con respecto al diagnóstico rápido de enfermedades infecciosas en una etapa temprana, en particular con respecto al diagnóstico rápido de enfermedades infecciosas, en algunos casos, puede realizarse la separación y cultivo de microorganismos patógenos de una muestra. Esto se debe a que la concentración de antígenos y/o anticuerpos contenidos dentro de la muestra es demasiado baja para que el examen inmunológico obtenga un resultado de inspección suficiente.

25 La separación y el cultivo de microorganismos patógenos requieren un procesado aséptico por parte de un operario con un equipamiento dedicado e información especial y varios días, lo que requiere un trabajo duro y mucho tiempo. Excepto en los hospitales de gran escala, los hospitales universitarios o similares, es imposible realizar fácilmente dicha operación.

Además, existen algunas clases de microorganismos que son difíciles de cultivar.

30 Por otra parte, se considera que el cribado genético del ácido nucleico diana posee una sensibilidad mayor que la del examen inmunológico. El cribado genético es muy eficaz en un caso en el que es difícil asegurar los antígenos y/o anticuerpos, y en otro caso donde se necesita un resultado de detección con una alta sensibilidad.

35 Sin embargo, no existe dicho kit para el cribado genético facilitado como un kit de POCT de acuerdo con el examen inmunológico.

40 En consecuencia, en muchos casos, el cribado genético raramente se realiza en las instalaciones médicas pequeñas, o similares. Por tanto, en las instalaciones médicas pequeñas, únicamente se recogen las muestras para ser enviadas a unas instalaciones externas para la consignación de las pruebas. Esto da como resultado que lleva mucho tiempo conocer sus resultados.

45 Por lo tanto, es muy útil transformar el cribado genético de una manera POCT. Esto se debe a que hace posible que también las instalaciones médicas pequeñas realicen por sí mismas un cribado genético rápido, resolviendo de este modo los problemas mencionados anteriormente con respecto al diagnóstico rápido de enfermedades infecciosas.

En el presente documento, el proceso del cribado genético realizado actualmente puede dividirse a grosso modo en las siguientes cuatro etapas.

Es decir:

50 (1) una primera etapa de:

recoger una muestra; y
después destruir las paredes celulares y/o membrana celular de la misma para dejar expuesto el ácido nucleico intracelular para que sea capturado por un transportador de fase sólida o similares;

(2) una segunda etapa de:

60 lavar, eliminar y separar contaminantes del mismo, tal como proteínas, por medio de un disolvente orgánico o similares; y
aislar únicamente el ácido nucleico;

(3) una tercera etapa de:

65 amplificar el ácido nucleico diana según una reacción de amplificación de ácido nucleico por medio de un molde del ácido nucleico separado; y

(4) una cuarta etapa de:

5 después de la reacción de amplificación del ácido nucleico, detectar el ácido nucleico diana amplificado directa o indirectamente por medio de sondas con marcadores; y realizar análisis cualitativo y/o análisis cuantitativo de la misma.

10 Una vez realizado el cribado genético en general, las cuatro etapas se realizan una por una de acuerdo con el funcionamiento manual de las mismas y/o utilizando un equipo físico y químico individual adecuado para cada una de las cuatro etapas. De esta manera, el trabajo debe ser muy complicado y debe llevar mucho tiempo.

15 Más concretamente, durante la operación del proceso de pretratamiento, pueden realizarse la preparación del disolvente, la separación centrífuga y el secado, y durante la reacción de amplificación del ácido nucleico, deben aislarse y mezclarse una gran cantidad de clases de componentes reactivos para preparar el reactivo para la reacción de amplificación del ácido nucleico.

20 En la práctica, durante la reacción de amplificación del ácido nucleico, la temperatura debe aumentarse y disminuirse repetidamente. Por tanto, también se requiere un dispositivo dedicado (por ejemplo, un termociclador) para cambiar la temperatura.

Los productos amplificados pueden ser detectados de diversas maneras, por ejemplo, electroforesis en gel y/o un método de medición de señales de una sustancia fluorescente de las sondas. De todos modos, deben prepararse aparatos de medición dedicados, lo que necesita mucho tiempo y costes enormes a la vista de este punto.

25 Durante la preparación del reactivo se dispensa una cantidad de varios [μ l] de enzima o similares a docenas de [μ l] de la enzima o similar. Sin embargo, la cantidad es tan pequeña que la dispensación puede olvidarse y/o realizarse erróneamente. También existe el problema de que puede aparecer fácilmente contaminación durante tantas etapas de operación.

30 En vista de dichas condiciones, también se ha ideado un dispositivo empaquetado en el que se realizan todas las etapas de: capturar el ácido nucleico; el lavado del mismo; realización de la reacción de amplificación del ácido nucleico del mismo; y detección del mismo.

35 El Documento 1 (Traducción japonesa N.º 2006-518221 de la solicitud PCT) da a conocer un método de procesamiento de una muestra.

En el Documento 1, se da a conocer un dispositivo reactivo que incluye: nueve segmentos divididos con sellos desprendibles; y reactivos empaquetados de antemano para su uso.

40 El líquido reactivo necesario respectivo se rellena y se cierra herméticamente dentro del segmento respectivo entre los nueve segmentos de un pequeño tubo flexible.

45 Controlando el dispositivo según una operación complicada, un actuador y una abrazadera se aplican sobre el segmento respectivo para liberar secuencialmente y empujar los segmentos fuera, respectivamente. De esta manera, se realizan las etapas anteriores de: mezclar el líquido reactivo respectivo; y el lavado del mismo, etc.

Finalmente, los genes capturados mediante lechos magnéticos de sílice y lavados son eluidos dentro de la solución de reacción, y pasan por la reacción de amplificación para ser detectados.

50 Cuando una fuente de campo magnético genera un campo magnético, los lechos magnéticos de sílice capturan los genes. Por otra parte, cuando la fuente del campo magnético desmantela el campo magnético, los lechos magnéticos de sílice liberan los genes.

55 Por tanto, pueden completarse todas las etapas necesarias con un solo dispositivo. Es difícil preparar y sellar el reactivo en el área respectiva del dispositivo.

El dispositivo, sin embargo, requiere tanto un mecanismo de control complicado como la fuente de campo magnético. Debe decirse que el grado de dificultad técnica es muy alto y que los costes de fabricación del dispositivo y los aparatos se vuelven también considerablemente caros.

60 El Documento 2 (solicitud de patente japonesa abierta a inspección pública N.º 2014-89201, un miembro de la familia del documento de patente EP1 325 298 B1) da a conocer un sistema de procesamiento de control de fluido.

65 Según el Documento 2, el fluido sistema de procesamiento de control de fluido se proporciona (dentro de un dispositivo) con una pluralidad de cámaras que incluye: una cámara de muestras; una cámara de solución; una cámara de lavado; una cámara de eliminación; y una cámara de mezcla principal.

El sistema de procesado de control de fluido se proporciona además con un puerto que conecta selectivamente las cámaras según la rotación de válvulas rotatorias. Por tanto, los componentes líquidos necesarios pasan a través de rutas de micro flujo y las etapas de pretratamiento de genes se realizan secuencialmente.

5 Los componentes líquidos son transportados según una fuerza de depresión y/o compresión causada por el movimiento hacia arriba y hacia abajo de un pistón. La fuerza dentro de la cámara principal pasa a través de ramales para moverse hacia un recipiente de reacción y después se realizan la reacción de amplificación y la detección correspondiente a la misma.

10 Por tanto, según el Documento 2, también pueden completarse todas las etapas necesarias dentro de un dispositivo. Sin embargo, también es difícil preparar y sellar el reactivo respectivo en el área respectiva en el dispositivo.

15 El dispositivo requiere tanto del complicado mecanismo de control que incluye el pistón como la rotación de las válvulas rotatorias dentro del aparato de medición. También debe decirse que los costes de fabricación del dispositivo y los aparatos se vuelven considerablemente caros.

LISTA DE DOCUMENTOS RELACIONADOS

20 Documento 1: Traducción japonesa N.º 2006-518221 de solicitud PCT
Documento 2: Solicitud de patente japonesa abierta a inspección pública N.º 2014-89201

OBJETOS Y SUMARIO DE LA INVENCION

25 En vista de lo anterior, es un objeto de la presente invención proporcionar un dispositivo para la reacción de amplificación del ácido nucleico capaz de realizar el cribado genético y la reacción de amplificación del ácido nucleico de una manera fácil, segura y rápida.

30 Un primer aspecto de la presente invención proporciona un dispositivo para la reacción de amplificación del ácido nucleico, que comprende: un estuche con una superficie superior que incluye una parte de goteo de muestra para recibir una muestra líquida que contiene ácido nucleico y siendo goteada la muestra líquida desde una boquilla; un tubo de reacción: que se proyecta hacia afuera desde un extremo del estuche; que incluye un espacio de almacenamiento dentro del mismo; y que está formado para que pueda instalarse dentro de un aparato de medición; un filtro configurado para portar en el mismo el ácido nucleico contenido en la muestra líquida; un cuerpo que soporta el filtro almacenado dentro del estuche para soportar el filtro de una manera en la que el filtro sea capaz de tomar: una posición de contacto en la que el filtro está en contacto con la muestra líquida justo por debajo de la parte de goteo de muestra; y una posición de reacción en la que el filtro está situado dentro del espacio de almacenaje del tubo de reacción; y material absorbente capaz de tomar: una posición de unión a presión en donde el material absorbente está unido mediante presión al filtro en la posición de contacto de modo que el filtro absorbe la muestra líquida en contacto con el mismo; y una posición de separación en donde el material absorbente se retira desde la posición de unión a presión para que el filtro pueda moverse libremente.

45 El primer aspecto de la invención proporciona además: un recipiente de líquido de limpieza que porta en el mismo fluido de limpieza; y un miembro que permite que el fluido de limpieza dentro del recipiente de líquido de limpieza fluya hacia la parte de goteo de muestra; y el tubo de reacción contiene al menos parte de un reactivo requerido para la reacción de amplificación de ácidos nucleicos.

50 Es preferible que una parte de presión impulse el cuerpo que soporta el filtro para que sea soportado de modo que el cuerpo que soporta el filtro pueda moverse desde la posición de contacto a la posición de reacción.

Es preferible que el tubo de reacción esté compuesto de un material transparente.

55 Es preferible que al menos parte del reactivo requerido para la reacción de amplificación del ácido nucleico contenga compuesto polimérico de fusión en caliente que se solidifique y/o gelifique antes de la reacción de amplificación del ácido nucleico, y que se caliente para volverse líquido en la reacción de amplificación del ácido nucleico, estando contenido al menos parte de reactivo dentro del tubo de reacción.

60 Es preferible que el material absorbente esté compuesto de un material blando absorbente de agua incluyendo un papel de filtro, un material polimérico absorbente y un papel de filtro de fibra de vidrio.

Es preferible que una partícula de sílice esté fija al filtro.

Es preferible que el filtro esté compuesto de una membrana polimérica.

65 Es más preferible que el filtro esté compuesto de PTFE hidrófilo (politetrafluoroetileno).

Es preferible que el cuerpo que soporta el filtro contenga al menos parte del reactivo requerido para la reacción de amplificación del ácido nucleico.

Efecto de la invención

- 5 Según la presente invención, se obtiene el siguiente beneficio.
- (1) Puesto que no es necesario que un operario realice complicadas etapas de preparación del reactivo y operación, el cribado genético puede realizarse rápida y fácilmente.
- 10 (2) Puede realizarse un cribado genético preciso con una alta sensibilidad. Además, puede resolverse el problema de contaminación en el cribado genético que suele suceder en general.
- (3) Adicionalmente, la disposición anterior del dispositivo para la reacción de amplificación del ácido nucleico permite realizar las etapas de: capturar genes; lavarlos; amplificarlos, etc..., de acuerdo únicamente con una operación de realización simple. También se reducen los costes tanto para el aparato de medición como para el cribado genético.

15 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

20 El dispositivo para la reacción de amplificación del ácido nucleico está configurado para que funcione según una operación comparativamente fácil. En otras palabras, también puede simplificarse el mecanismo de operación del mismo. Como resultado, también puede fabricarse de un modo razonable un aparato de medición dedicado para el mismo.

25 De esta manera, al utilizar el sistema de cribado genético según la presente invención, el cribado puede hacerse de una manera fácil, rápida y a bajo coste.

Según la presente invención, casi todos los componentes necesarios existen dentro de un dispositivo para la reacción de amplificación del ácido nucleico 10, y es suficiente para preparar únicamente unas pocas clases de reactivo. Además, la operación se realiza fácilmente simplemente manejando el aparato de medición dedicado.

30 En primer lugar, existe una ventaja en los costes de producción tanto para el reactivo como para el aparato de medición. En segundo lugar, también pueden reducirse los problemas durante la operación de medición.

35 Según la presente invención, es suficiente que un operario gotee una muestra líquida en una parte 101 de goteo de muestra del dispositivo 10 y ajuste el dispositivo 10 goteado al aparato de medición 700 dedicado. Si es así, el operario será capaz de obtener un resultado del mismo tras un tiempo de reacción predeterminado.

40 Cuando el dispositivo 10 se inserta en el aparato de medición 700, el tubo de reacción 200 del dispositivo 10 se inserta y se fija firmemente al bloque de control de la temperatura 703 del aparato de medición 700. En el bloque de control de la temperatura 703, se realiza la reacción de amplificación del ácido nucleico.

45 Un punto importante de la presente invención es como se indica a continuación. En primer lugar, los genes dentro de la muestra líquida goteada en la parte 101 de goteo de muestra son capturados y lavados en el filtro 301 dentro del dispositivo 10. Y después, en segundo lugar, los genes se mueven dentro del tubo de reacción 200 en el que se realiza la reacción de amplificación del ácido nucleico.

50 En un estado inicial antes de la medición, el filtro 301 y el tubo de reacción 200 dentro del dispositivo 10 están situados de un modo separado, respectivamente. Se gotea una muestra en la parte 101 de goteo de muestra. Después, se capturan los genes diana en el filtro 301, cuando la muestra líquida pasa a través del filtro 301.

55 El primer elemento de presión 1 proporcionado con el aparato de medición 700 se acciona para mover el recipiente 120 de líquido de limpieza que sella el fluido de limpieza en el mismo, el fluido de limpieza dentro del mismo recipiente 120 se suministra al filtro 301 para lavar los genes.

El filtro 301 es transportado por el cuerpo 300 que soporta el filtro. En el interior del dispositivo 10, el soporte 501 se apoya tanto sobre la placa 400 de instalación del material absorbente como en el cuerpo 300 que soporta el filtro de modo que una por presión el material absorbente 401 sobre el filtro 301.

60 Cuando se acciona el segundo elemento de presión 2 del aparato de medición 700 para hacer que se mueva el soporte 501, el cuerpo 300 que soporta el filtro y el filtro 301 se liberan del estado de unión a presión de modo que se pueden moverse.

65 El tercer elemento de presión 3 del aparato de medición 700 mueve el cuerpo 300 que soporta el filtro (en particular, un nervio de conducción 303) de modo que hace que el filtro 301 se mueva hacia una parte profunda del interior del tubo de reacción 200. Como resultado, el filtro 301 entra en contacto con el reactivo 201.

De esta manera, los genes lavados en la muestra líquida capturados por el filtro 301 también se insertan en el tubo de reacción 200.

5 La reacción de amplificación de ácidos nucleicos también puede realizarse utilizando los genes insertados y el reactivo 201 para la reacción de amplificación del ácido nucleico que se ha rellenado por adelantado mientras el bloque de control de la temperatura 703 del aparato de medición 700 controla la temperatura del mismo calentando y/o enfriando repetidamente el mismo.

10 Más concretamente según se muestra en la figura 1, en primer lugar, un operario recoge una muestra de un paciente en el contenedor 801 de extracción dedicado para extraer los genes contenidos en el mismo. Y en segundo lugar, el operario gotea una muestra líquida en la parte 101 de goteo de muestra del dispositivo 10 por medio de la boquilla de goteo 800.

15 Como se muestra en la figura 2, después de haber confirmado que se ha absorbido la muestra líquida, el operario inserte este dispositivo 10 en el aparato de medición 700 dedicado.

20 Los genes dentro de la muestra goteada son capturados en el filtro 301 portado por el cuerpo 300 que soporta el filtro, y el líquido innecesario es eliminado al absorberse por el material absorbente 401 unido mediante presión a una superficie inferior del filtro 301.

Para mejorar la eficacia de la captura de los genes, es preferible aplicar partículas de sílice sobre el filtro 301.

25 El recipiente 120 de líquido de limpieza en el que se ha rellenado el fluido de limpieza se ajusta en el interior del dispositivo 10 de forma móvil, y se sella un puerto de inyección del recipiente 120 de líquido de limpieza por medio de una membrana rompible.

30 Cuando el primer elemento de presión 1 del aparato de medición 700 aplica fuerza sobre el recipiente 120 de líquido de limpieza desde el exterior del mismo, el recipiente 120 de líquido de limpieza se mueve. Cuando la proyección de ruptura 111 dentro del dispositivo 10 se rompe atravesando el miembro rompible de sellado, el fluido de limpieza interno se descarga a la parte 101 de goteo de muestra por medio del aliviadero 101b.

Después de haber lavado los genes en el filtro 301, el fluido de limpieza pasa a través del filtro 301 para ser absorbido por el material absorbente 401.

35 Aquí, es necesario que la muestra líquida y el fluido de limpieza suministrados desde la parte 101 de goteo de muestra pasen suavemente a través del filtro 301 de acuerdo a un fenómeno de capilaridad para que sean filtrados hacia el material absorbente 401 en la superficie inferior.

40 En consecuencia, la parte 101 de goteo de muestra y el material absorbente 401 están unidos a presión entre sí por lo que están firmemente ajustados en una dirección vertical.

45 El material absorbente 401 tiene un volumen que puede absorber por completo el líquido en él, y está fijado a la placa 400 de instalación del material absorbente. Además, la placa 400 de instalación del material absorbente está soportada por la placa 500 de soporte desde un lado inferior de modo que el filtro 301 está unido indirectamente a presión al material absorbente 401.

50 Cuando el segundo elemento de presión 2 del aparato de medición 700 hace que se mueva la placa 500 de soporte, la pieza de colocación 402 de la placa 400 de instalación del material absorbente se separa del soporte 501, y la placa 400 de instalación del material absorbente se libera junto con el cuerpo 300 que soporta el filtro del estado de unión por presión.

De esta manera, el filtro 301 del cuerpo 300 que soporta el filtro también se libera del estado de unión por presión en donde el filtro 301 está ajustado entre la parte 101 de goteo de muestra y el material absorbente 401.

55 Después de eso, el tercer elemento de presión 3 del aparato de medición 700 hace que el cuerpo 300 que soporta el filtro, en particular el nervio de conducción 303, se mueva para que el filtro 301 se inserte en el tubo de reacción 200.

60 El tubo de reacción 200 tiene contenido de antemano en el mismo el reactivo 201 requerido tanto para la reacción de amplificación del ácido nucleico como la detección de los genes, y el reactivo 201 se fija cuando el filtro 301 se ha insertado en el bloque de control de la temperatura 703 del aparato de medición 700.

65 Los genes capturados por el filtro 301 del cuerpo 300 que soporta el filtro se ponen en el tubo de reacción 200 en contacto con el reactivo 201. Después de esto, la reacción de amplificación correspondiente a los genes puede realizarse controlando la temperatura (aumentando/disminuyendo repetidamente la temperatura de los mismos, o similares) por medio del bloque de control de la temperatura 703 del aparato de medición 700.

Después de haber completado la reacción de amplificación, la unidad de medición de la fluorescencia 704 del aparato de medición 700 puede detectar producto amplificado dentro del tubo de reacción 200 para determinar la existencia de los genes diana.

5 Según la presente invención, la disposición interna y el sistema del dispositivo 10 están configurados como se ha mencionado anteriormente. Por lo tanto, es suficiente que el operario gotee la muestra líquida en el mismo y lo ajuste únicamente en el aparato de medición 700 dedicado. Esta simple operación permite realizar el cribado genético rápida y fácilmente.

10 Ahora se describirán más concretamente realizaciones de la presente invención con referencia a los dibujos adjuntos.

La figura 1 es un diagrama en perspectiva de un dispositivo para la reacción de amplificación del ácido nucleico cuando se gotea la muestra en una realización de la presente invención; la figura 2 es un diagrama en perspectiva de un aparato de medición; la figura 3 es un plano de superficie que muestra el principio del aparato de medición; y la figura 15 4 es una vista en perspectiva de despiece del dispositivo para la reacción de amplificación del ácido nucleico.

El dispositivo para la reacción de amplificación del ácido nucleico 10 incluye los siguientes elementos.

20 Como se muestra en la figura 1, el estuche superior 100 incluye una superficie superior provista de la parte 101 de goteo de muestra que recibe una muestra líquida que puede contener ácido nucleico goteado desde la boquilla 800.

Un operario sujeta con su mano 802 el contenedor de extracción 801 que almacena la muestra líquida que contiene ácido nucleico en una dirección en la que la boquilla 800 está orientada hacia abajo y gotea una cantidad adecuada de la muestra líquida desde la boquilla 800 en la parte 101 de goteo de muestra.

25 El puerto de descarga 101a está abierto en la parte más baja de la parte 101 de goteo de muestra, y el filtro 301 está situado justo por debajo del puerto de descarga 101a.

30 El tubo de reacción 200 se proyecta hacia afuera desde una parte del extremo izquierdo de la figura 1, posee un espacio de almacenaje en el mismo y está formado de modo que es capaz de ser instalado dentro del aparato de medición 700.

El filtro 301 del mismo porta el ácido nucleico contenido en la muestra líquida.

35 El cuerpo 300 que soporta el filtro se almacena en el interior de un estuche que incluye: el estuche superior 100; y el estuche inferior 600, y contiene el filtro 301 de una manera que el filtro 301 es capaz de tomar:

40 una posición de contacto en donde el filtro 301 está en contacto con la muestra líquida justo por debajo del puerto de descarga 101a de la parte 101 de goteo de muestra; y una posición de reacción en donde el filtro 301 está situado dentro del espacio de almacenaje del tubo de reacción 200.

El material absorbente 401 puede tomar:

45 una posición de unión a presión en donde el material absorbente 401 está unido mediante presión al filtro 301 en la posición de contacto de modo que el filtro 301 absorbe la muestra líquida en contacto con el mismo; y una posición de separación en donde el material absorbente 401 se retira desde la posición de unión a presión de modo que el filtro 301 puede moverse libremente.

50 El recipiente 120 de líquido de limpieza porta en el mismo el líquido de limpieza. La proyección de ruptura 111 se proyecta desde la tapa del recipiente 110 de líquido de limpieza hacia el recipiente 120 de líquido de limpieza.

55 Cuando la proyección de ruptura 111 se rompe a lo largo de un sello de aluminio del recipiente 120 de líquido de limpieza, el fluido de limpieza dentro del recipiente 120 de líquido de limpieza puede descargarse a la parte 101 de goteo de muestra por medio del aliviadero 101b provisto de modo que está orientado hacia la parte 101 de goteo de muestra.

A continuación en referencia a la figura 2 y la figura 3, se explicará ahora el aparato de medición 700.

60 Como se muestra en la figura 2, el aparato de medición 700 en esta realización está formado con una forma de una caja sustancialmente trapezoidal que incluye una cara frontal inclinada en una dirección diagonalmente superior de aproximadamente 30 grados, y la pantalla del monitor 702 y la puerta 705 están dispuestos en la superficie frontal de la caja.

65 La pantalla del monitor 702 muestra la situación de operación actual para su revisión por el operario. No es necesario decir que puede añadirse una función de impresora, si se necesita.

La puerta 705 se proporciona para proteger del exterior la estructura interna del aparato de medición 700. En esta realización, un borde superior del marco de la puerta 705 puede montarse de modo que pueda abrirse y cerrarse en la sección de la placa superior del aparato de medición 700 con una bisagra (no mostrada).

5 Como se muestra en la figura 2, cuando se abre la puerta 705, la parte derecha de la superficie frontal del aparato de medición 700 queda expuesta al exterior.

El puerto de inserción 701 en el que puede insertarse el dispositivo 10 está dispuesto en la parte derecha.

10 Después de haber goteado la muestra líquida como se muestra en la figura 1, el operario sujeta la parte de unión 102 del dispositivo del dispositivo 10 en una dirección en la que el tubo de reacción 200 está orientado hacia adelante para insertar el dispositivo 10 a través del puerto de inserción 701.

15 Como se ha mencionado anteriormente, ya que el puerto de inserción 701 está inclinado en una dirección diagonalmente superior de aproximadamente 30 grados, el dispositivo 10 también está dispuesto para que esté inclinado de un modo similar al mismo.

20 Después de esto, es suficiente que el operario introduzca las instrucciones de operación en el aparato de medición 700. Los procesos requeridos para la reacción de amplificación nuclear se realizan automáticamente dentro del aparato de medición 700.

El dispositivo 10 se ajusta en el aparato de medición en un ángulo de aproximadamente 30 grados, y el tubo de reacción se asienta firmemente en el bloque de control de la temperatura del aparato de medición.

25 El dispositivo 10 se inserta oblicuamente en un ángulo dentro del aparato de medición 700. La razón es la siguiente.

30 La muestra líquida goteada no se derrama desde la parte 101 de goteo de muestra. Y, en el interior del tubo de reacción 200, el reactivo 201 requerido para la reacción de amplificación del ácido nucleico permanece en el bloque de control de la temperatura 703. El ángulo es introducido para mantener esta situación.

35 Cuando el ángulo es demasiado grande y casi perpendicular, el reactivo 201 dentro del tubo de reacción 200 se almacena en la parte inferior del mismo y puede tocar fácilmente el bloque de control de la temperatura 703. Aunque la reacción pueda tener lugar correctamente, existe el riesgo de que la muestra líquida goteada y/o el fluido de limpieza fluya o fluyan fuera del dispositivo 10 en mitad de la operación.

Por el contrario, cuando el ángulo es demasiado pequeño y caso horizontal, se disminuye el riesgo de que la muestra goteada se derrame fuera de la parte 101 de goteo de muestra.

40 Sin embargo, existe otro riesgo de que:

45 la muestra 201 en el tubo de reacción 200 no se almacene bien en la parte inferior; por lo tanto el control de la temperatura por el bloque de control de la temperatura 703 no es eficaz; y la reacción de amplificación del ácido nucleico no procede bien.

Una vez se ha ajustado el dispositivo 10 como se ha mencionado anteriormente y se muestra en la figura 3, un extremo distal del tubo de reacción 200 se inserta en el bloque de control de la temperatura 703 y el dispositivo 10 todavía permanece quieto dentro del aparato de medición 700.

50 Un elemento de Peltier (no mostrado) se instala dentro del bloque de control de la temperatura 703 y la temperatura de los componentes que contienen ácido nucleico en el tubo de reacción 200 se ajusta de acuerdo con las condiciones de temperatura que se mencionan después.

55 El bloque de control de la temperatura 700 aumenta/disminuye repetidamente la temperatura por medio del elemento de Peltier, y la temperatura se transmite al reactivo 201 dentro del tubo de reacción 200. En consecuencia, es preferible que el tubo de reacción 200 esté compuesto de un material que sea tan delgado como sea posible y posea una alta difusividad térmica.

60 Para que tenga una excelente respuesta térmica, es preferible que el tubo de reacción 200 y el bloque de control de la temperatura 700 estén en contacto entre sí tan estrechamente como sea posible.

65 La unidad de medición de la fluorescencia 704 se almacena en el aparato de medición 700. La unidad 704 incluye los siguientes elementos. El iluminador 704a emite fluorescencia. El sistema óptico 704c ajusta una trayectoria óptica de fluorescencia para irradiar la fluorescencia hacia los dentro del tubo de reacción 200 y transmite la fluorescencia reflejada. El sensor receptor de luz 704b recibe la fluorescencia transmitida (señales de fluorescencia emitidas por el reactivo 201) para generar señales que reflejen la misma.

También es posible abrir una pequeña ventana en una parte del bloque de control de la temperatura 703 y medir las señales de fluorescencia emitidas por el reactivo 201 interno utilizando la unidad de medición de la fluorescencia 704.

5 Un sistema de accionamiento lineal (no mostrado) acciona el primer elemento de presión 1, el segundo elemento de presión 2 y el tercer elemento de presión 3, respectivamente (Véanse, la figura 6, la figura 10 y la figura 11) se proporciona dentro del aparato de medición 700. El primer elemento de presión 1, el segundo elemento de presión 2 y el tercer elemento de presión 3 aplican respectivamente una fuerza externa al dispositivo 10 situado dentro del aparato de medición 700.

10 A continuación en referencia a la figura 4, la figura 5 y la figura 8, se explicarán ahora detalles de la estructura interna (especialmente una parte baja) del dispositivo 10.

15 En la figura 4, se muestra la relación de los miembros en una dirección vertical perpendicular de una manera que se corresponde generalmente a después de haberse montado.

El miembro más bajo es el estuche inferior 600 y el estuche inferior 600 soporta los miembros por encima del mismo.

20 Como se muestra en la figura 8(b), para permitir insertar el segundo elemento de presión 2, la abertura 602 se abre en la parte inferior del lado opuesto del tubo de reacción 200. Un par de topes 601 y 601 se forman hacia arriba proyectándose en ambos lados de la abertura 602.

La placa 500 de soporte está situada justo por encima del estuche inferior 600.

25 Un par de soportes 501 y 501 se erigen desde la placa 500 de soporte hacia el soporte de la superficie inferior en la pieza de colocación 402 de la placa 400 de instalación del material absorbente por encima de la placa 500 de soporte.

30 Se forma un par de nervios en el lado opuesto del tubo de reacción 200 de la placa 500 de soporte de un modo que la abertura 602 no sea cerrada por los mismos.

Los extremos distales del par de nervios se forman para que sean un miembro de bloqueo 502 doblado hacia afuera en forma de un gancho.

35 Como se muestra en la figura 8(b), la pieza de presión 503 se forma en la parte central del par de nervios.

En un estado normal según se muestra en la figura 8(b), el miembro de bloqueo 502 y los topes 601 y 601 están acoplados entre sí, y la placa 500 de soporte no se mueve en una dirección longitudinal al estuche inferior 600.

40 Por el contrario, cuando el elemento de presión 2 se inserta dentro de la abertura 602 para aplicar una fuerza externa (hacia el tubo de reacción 200) sobre la pieza de presión 503 en la dirección longitudinal, el miembro de bloqueo 502 se deforma elásticamente hacia el interior para ser liberado de los topes 601 y 601.

45 Por tanto, la placa 500 de soporte se vuelve capaz de moverse relativamente a una distancia "d" como máximo hasta estuche inferior 600.

En un estado inicial, la placa de instalación de los materiales absorbentes 400 pertenece a los miembros en una etapa intermedia.

50 La placa 400 de instalación del material absorbente es un miembro que soporta el material absorbente 401 (los componentes del mismo se explicarán con todo detalle más tarde) que absorbe líquido y tiene la misma anchura en el lado opuesto del tubo de reacción 200 hasta la pieza escalonada 403.

55 De ahí en adelante, se forma la pieza de cuello 404 para que sea más estrecha que la anterior, y de nuevo se forma la pieza de colocación 402 para que tenga una anchura más amplia que la de la pieza de cuello 404.

En el presente documento, en un estado normal según se muestra como ampliaciones en la figura 9(a), la pieza de colocación 402 se coloca en la parte superior del soporte 501.

60 Por el contrario, cuando el segundo elemento de presión 2 empuja la pieza de presión 503 para liberarla del acoplamiento como se ha mencionado anteriormente, la placa 500 de soporte se mueve la distancia "d" al máximo en la dirección longitudinal.

65 El tablero de instalación de la placa de absorción 400 se forma, sin embargo, sin la capacidad de moverse en la dirección longitudinal. En consecuencia, según se muestra en la figura 9(b), el soporte 501 y la pieza de colocación 402 están separados entre sí, y el soporte 501 corre dentro de la pieza de cuello 404.

Como resultado, la placa 400 de instalación del material absorbente pierde su soporte, y cae de un modo natural por su gravedad (hacia la etapa inferior) para solaparse con la placa 500 de soporte.

5 Como se muestra en la figura 4, el tubo de reacción 200 del dispositivo 10 insertado en el aparato de medición 700 está fijado firmemente al bloque interno 703 de control de la temperatura en el aparato de medición 700.

El dispositivo 10 se monta como se muestra en la figura 4.

10 El dispositivo 10 incluye: el estuche superior 100 y el estuche inferior 600 que están combinados entre sí para formar el estuche; y el tubo de reacción 200 se proyecta desde el estuche. El estuche superior 100 se proporciona con: la pieza de goteo 101 de la muestra y; la pieza de unión 102 del dispositivo.

15 El recipiente 120 de líquido de limpieza y la cubierta para el recipiente 110 de líquido de limpieza están unidos con el estuche superior 100 como una estructura para enjuagar el fluido de limpieza.

20 En el interior del dispositivo 10, están instalados el cuerpo 300 que soporta el filtro, la placa 400 de instalación del material absorbente, la placa 500 de soporte, etc... Estos miembros están para: capturar y lavar genes diana desde la muestra goteada sobre la parte 101 de goteo de muestra; y hacer además que los genes lavados se muevan hacia el tubo de reacción 200.

En lo sucesivo en el presente documento, se explicarán ahora los detalles adicionales.

25 La figura 5(a) es un diagrama en perspectiva del cuerpo que soporta el filtro en la realización de la presente invención, la figura 5(b) es un diagrama en perspectiva del recipiente de líquido de limpieza, y la figura 5(c) es un diagrama en perspectiva de la cubierta para el recipiente de líquido de limpieza.

Como se muestra en la figura 5(a), se abre un agujero en un extremo distal del cuerpo 300 que soporta el filtro, y el filtro 301 se pega en este agujero de manera que el líquido pueda pasar a través del mismo.

30 Es preferible que se apliquen partículas de sílice sobre el filtro 301 para que los genes puedan ser capturados por el filtro 301 con alta eficacia.

35 También es preferible que los componentes reactivos secados requeridos para la reacción de amplificación del ácido nucleico se apliquen y se fijen sobre la pieza 302 de aplicación del reactivo adyacente al filtro 301.

40 Todos los componentes reactivos pueden almacenarse dentro del tubo 200. Sin embargo, para mejorar más la estabilidad, es preferible que todos los componentes reactivos no sean almacenados en el mismo, sino que una parte de los componentes reactivos sean separados de los mismos para su instalación. En consecuencia, es suficiente que al menos la parte de los componentes reactivos se apliquen en el mismo, si es necesario.

45 Para evitar que se evapore la muestra líquida dentro del tubo de reacción 200 durante la reacción de amplificación, la junta tórica 304 es un miembro de sellado que sella firmemente el cuerpo que soporta el filtro y el tubo de reacción por lo que el cuerpo que soporta el filtro y el tubo de reacción están firmemente en contacto entre sí. Por supuesto, puede usarse un miembro de sellado convencional distinto de la junta tórica en lugar de la misma.

A continuación, como se muestra en la figura 5(b), el fluido de limpieza para lavar los genes capturados por el filtro 301 se dispensa en el recipiente 120 de líquido de limpieza, y el puerto de inyección 121 del mismo se cierra con un sello de aluminio.

50 Se proporciona un par de protuberancias 122 y 122 que se proyectan hacia afuera con las superficies laterales del recipiente 120 de líquido de limpieza, respectivamente. Por tanto, esta disposición está configurada para hacer que el recipiente 120 de líquidos se mueva.

55 Como se muestra de la figura 6(a) a la figura 6(c), cuando se mueve el primer elemento de presión 1 presiona las proyecciones 122, el recipiente 120 de líquido de limpieza también se mueve dentro del dispositivo 10.

60 Como resultado de este movimiento (véase la figura 5(c)), la proyección de ruptura 111 proporcionada desde la cubierta para el recipiente 110 de líquido de limpieza hasta el recipiente 120 de líquido de limpieza se rompe a lo largo del cierre de aluminio que cierra el puerto de inyección 121, y el fluido de limpieza fluye en la parte 101 de goteo de muestra a través del aliviadero 101b.

65 En el presente documento, la proyección de ruptura 111 tiene un tamaño que ocupa casi todo el volumen del recipiente 120 de líquido de limpieza. En consecuencia, el fluido de limpieza dentro del recipiente 120 de líquido de limpieza es empujado fuera por la proyección de ruptura 111, y casi todo el fluido de limpieza fluye por compulsión en la parte 101 de goteo de muestra.

De la figura 7(a) a la figura 7(c) son vistas de sección correspondientes de la figura 6(a) a la figura 6(c), respectivamente.

5 En esta realización, la proyección de ruptura 111 es un artículo moldeado de forma integral con la cubierta para el recipiente 110 de líquido de limpieza, también está instalado dentro de la cubierta para el recipiente 110 de líquido de limpieza, y se rompe a través del miembro de sellado del recipiente 120 de líquido de limpieza.

10 La presente invención no se limita a dicha estructura. En otras palabras, es suficiente que el almacenaje y el suministro del fluido de limpieza puedan realizarse por medio de una estructura convencional distinta a la anterior en su lugar.

Siempre que pueda conseguirse una función similar a la anterior, tanto el mecanismo de accionamiento del aparato de medición 700 como el movimiento del recipiente 120 de líquido de limpieza no se limitan a este ejemplo.

15 La figura 8(a) muestra una relación posicional del cuerpo 300 que soporta el filtro, el material absorbente 401 y la placa 500 de soporte.

20 El material absorbente 401 está compuesto de un material comparativamente blando, tal como papel de filtro, material polimérico absorbente, un papel de filtro de fibra de vidrio, o similares, y absorbe la muestra líquida goteada y el fluido de limpieza que fluye a través del filtro 301.

25 La placa 400 de instalación del material absorbente sobre la que se ha fijado el material absorbente 401 está soportada por un par de soportes 501 y 501 de la placa 500 de soporte para que se mantenga en un estado elevado dentro de dispositivo 10. De esta manera, el material absorbente 401 se dispone dentro del dispositivo de una manera que el material absorbente 401 está unido firmemente mediante presión a una superficie inferior del filtro 301.

De la figura 10(a) a la figura 10(f) son vistas seccionales que muestran los estados internos del dispositivo 10 cuando el segundo elemento de presión 2 se mueve dentro del dispositivo 10.

30 Cuando el elemento de presión 2 se inserta desde la abertura 602 del estuche inferior 600 para aplicar fuerza a la pieza de presión 503 de la placa 500 de soporte, la placa 500 de soporte se mueve desde una primera posición de la figura 10(a) a través de una segunda posición de la figura 10(b) a una tercera posición de la figura 10(b).

35 Cuando el soporte 501 se separa de la placa 400 de instalación del material absorbente, la placa 400 de instalación del material absorbente pierde el soporte de la misma para caer hacia la etapa más baja (véase, una posición de la figura 10(e)) a través de una posición de la figura 10(d).

Al mismo tiempo, el cuerpo 300 que soporta el filtro también cae hacia una posición de la figura 10(f) para solaparse con el estuche inferior 600.

40 De esta manera, el cuerpo 300 que soporta el filtro pasa a estar en un estado móvil desde el estado de unión por presión, y una parte inferior del nervio de conducción 303 se proyecta más allá hacia abajo desde el estuche inferior 600 a través de una rendija (no mostrada) del estuche inferior 600.

45 Después de eso, como se muestra en la figura 11(a), cuando el tercer elemento de presión 3 empuja la parte inferior de los nervios de conducción 303 y 303 que se proyectan hacia abajo desde el estuche inferior 600, el cuerpo 300 que soporta el filtro se mueve desde una posición de la figura 11(a) a través de un estado de la figura 11(b). Y el filtro 301 en el extremo distal y la pieza 302 de aplicación del reactivo se mueven hasta el final (véase, una posición de la figura 11 (c)) del movimiento.

50 Como resultado, como se muestra en la figura 11(c), el filtro 301 y el ácido nucleico portado por el mismo son empujados completamente en el reactivo 201 del tubo de reacción 200.

55 El reactivo 201 requerido para la reacción de amplificación del ácido nucleico se almacena dentro del tubo de reacción 200. En consecuencia, para evitar que el reactivo dentro del tubo de reacción 200 se evapore durante la reacción de amplificación, es preferible que una entrada hacia el reactivo 201 se cierre con un sello de aluminio.

En este caso, un extremo distal del cuerpo 300 que soporta el filtro puede formarse con una forma afilada que puede operarse para romper el sello de aluminio.

60 Los componentes del reactivo 201 pueden contener: enzima para la reacción de amplificación; sustrato; componentes tampón; conjuntos de cebadores específicos; y sondas de marcado por fluorescencia o similares en una región de detección. Para mejorar la estabilidad en la conservación, una parte de estos componentes del reactivo 201 puede instalarse dentro del tubo de reacción 200 y el resto de estos componentes pueden instalarse dentro de la pieza 302 de aplicación del reactivo del cuerpo 300 que soporta el filtro para que se separe del mismo.

65

En un estado líquido, el reactivo 201 dentro del tubo de reacción 200 puede no quedarse quieto en la parte inferior adecuada para la reacción causado por la vibración o similares durante el transporte y/o procesado con respecto al dispositivo 10. En consecuencia, es preferible que el reactivo 201 se fije en un estado sólido y/o un estado gelificado para que el reactivo 201 no pueda moverse fácilmente hasta el comienzo de la reacción.

5 Es preferible que, al fabricar el reactivo, un compuesto polimérico de fusión por calor (tal como agarosa o similares) se caliente y dispense en el tubo 200 con los componentes del reactivo 201 para que se fijen y/o gelifiquen enfriando el mismo después de eso.

10 De esta manera, en caso de que la vibración, rotación, etc.... al transportar el dispositivo 10 intentan hacer que se mueva el dispositivo 10, el reactivo 201 no puede moverse puesto que está mantenido con seguridad en la parte inferior del tubo de reacción 200.

15 Por el contrario, inmediatamente antes de la reacción de amplificación del ácido nucleico, aumentando la temperatura para que sea de 95 grados centígrados o similar, el reactivo 201 gelificado dentro del tubo de reacción 200 se disuelve para que esté en un estado líquido, y la reacción de amplificación del ácido nucleico puede iniciarse con facilidad sin ningún problema.

20 Por tanto, el dispositivo en esta realización puede completarse disponiendo y montando los miembros preparados como se ha mencionado anteriormente según se muestra en la figura 4.

(Medición)

25 Cuando el operario realiza realmente la medición, se recoge una muestra líquida con el contenedor de extracción 801, se extraen los genes del mismo y se gotea una cantidad necesaria de la muestra líquida en la parte 101 de goteo de muestra del estuche superior 100 para colocarla en el aparato de medición 700 dedicado. Esta operación es muy fácil.

30 Para almacenar la solución de la parte 101 de goteo de muestra y para asegurar la cantidad de líquido tras la reacción, es preferible que el dispositivo 10 se inserte en el aparato de medición 700 inclinado en el ángulo de 30 grados con respecto a una dirección horizontal.

Después de eso, no es necesario que el operario realice una operación problemática. Al contrario, todas las etapas necesarias se realizan automáticamente por el propio aparato de medición 700 dedicado.

35 Los genes dentro del líquido de extracción goteado son capturados por las partículas de sílice en el filtro 301 portado en el cuerpo 300 que soporta el filtro.

El líquido goteado pasa a través del filtro 301, y es absorbido y retirado por el material absorbente 401 en contacto con la superficie inferior y que está instalado en el filtro 301.

40 Después de eso, el primer elemento de presión 1 del aparato de medición 700 empuja el recipiente 120 de líquido de limpieza dentro del dispositivo 10 para romper el sello de aluminio. Y el fluido de limpieza se descarga en la parte 101 de goteo de muestra para lavar los genes capturados por las partículas de sílice en el filtro 301.

45 El fluido de limpieza también pasa a través del filtro 301 para ser absorbido y eliminado por el material absorbente 401.

Después de eso, el segundo elemento de presión 2 del aparato de medición 700 se acciona para hacer que se mueva la placa 500 de soporte que incluye el soporte 501.

50 El movimiento común del soporte 501 y la placa 500 de soporte hace que se libere el acoplamiento entre el soporte 501 y la pieza de colocación 402, de este modo la placa 400 de instalación del material absorbente cae hacia la etapa más baja.

55 Al mismo tiempo, el cuerpo 300 que soporta el filtro también cae desde la etapa intermedia hacia la etapa más baja. Como resultado, el cuerpo 300 que soporta el filtro pasa a un estado móvil del estado de unión por presión en donde el filtro 301 está unido mediante presión entre la parte 101 de goteo de muestra del estuche superior 100 y el material absorbente 401.

60 Después de haber permitido que se mueva el cuerpo 300 que soporta el filtro, el movimiento del tercer elemento de presión 3 del aparato de medición 700 hace que el filtro 301 sea empujado en el reactivo 201 dentro del tubo de reacción 200.

65 De esta manera, los genes capturados por el filtro 301 son transportados al interior del tubo de reacción 200. Y después, por medio del reactivo 201 dentro del tubo de reacción 200, se inicia la reacción de amplificación en el bloque de control de la temperatura 703 del aparato de medición 700.

Las condiciones de temperatura para la amplificación de genes pueden ser diferentes según los artículos de medición. Por ejemplo, la primera temperatura de 95 grados centígrados y la segunda temperatura de 65 grados centígrados se repiten para que se produzca la hibridación con los cebadores y la reacción de reproducción, teniendo lugar de este modo la reacción de amplificación del ácido nucleico.

Para detectar la reacción de amplificación del ácido nucleico, es preferible que se usen las sondas marcadas o similares emiten señales al conjugarse específicamente con el producto amplificado.

La medición de las señales puede hacerse fácilmente por medio del sensor receptor de luz 704b del aparato de medición 700, estando instalado el sensor receptor de luz 704b en una superficie lateral del tubo de reacción.

Es decir, el iluminador 704a de la unidad de medición de la fluorescencia 704 irradia luz excitada desde la superficie lateral del tubo de reacción 200 transparente, y el sensor receptor de luz 704b detecta y mide una cantidad de fluorescencia generada.

Es preferible que el aparato de medición 700 muestre un resultado de medición en la pantalla de control 702 y/o además imprima un resultado de detección.

Ejemplos

(Detección de genes PI tras el diagnóstico neumonía por micoplasma)

Ahora se mostrará más adelante cómo detectar genes PI de *Mycoplasma pneumoniae* (patógeno de la neumonía por micoplasma) por medio del dispositivo 10 según la presente invención.

(Fabricación del dispositivo 10 para la detección de *Mycoplasma*)

En un extremo distal del cuerpo 300 que soporta el filtro, se abre un agujero y el filtro 301 es transportado por él. Para capturar genes, el orificio porta sobre el mismo el filtro 301 compuesto de una membrana de PTFE hidrófilo cortada con la forma de una banda con un tamaño de 5 x 8 [mm].

Se han aplicado sobre la membrana 40 [μg] de partículas de sílice que poseen 1 [μm] de un diámetro de partícula promedio sobre la membrana para que se seque de modo que los genes puedan capturarse con alta eficacia.

Se han aplicado 8 [μl] del reactivo de reacción 1 que contiene ADN polimerasa para que se sequen sobre la pieza 302 de aplicación del reactivo del cuerpo 300 que soporta el filtro.

Se han dispensado 1,2 [ml] de agua purificada como el fluido de limpieza en el recipiente 120 de líquido de limpieza, y el sello de aluminio se ha pegado sobre el puerto de inyección 121 para formar un cuerpo sellado.

Se han solapado material polimérico absorbente y un papel de filtro de fibra de vidrio entre sí como el material absorbente 401 para ser cortados con un tamaño de 25 [mm] x 25 [mm] y un ancho de 2,5 [mm] para formar el material absorbente. Se ha instalado el material absorbente para completar la placa 400 de instalación del material absorbente.

Dentro del tubo de reacción 200, se han dispensado para que se gelifiquen 50 [μl] del reactivo de reacción 2 que contiene: agarosa: conjuntos de cebadores para detectar *Mycoplasma*; y sondas de tipo "Q". Una boca del tubo de reacción 200 se ha sellado con un sello de aluminio para formar un cuerpo sellado.

El cuerpo 300 que soporta el filtro, el recipiente 120 de líquido de limpieza, la placa 400 de instalación del material absorbente y el tubo de reacción 200 se han preparado de este modo y se han combinado con: el estuche superior 100; la cubierta para el recipiente 120 de líquido de limpieza; la placa 500 de soporte; y el estuche inferior 600.

Como se muestra en la figura 4, se ha hecho la disposición de lo anterior y se ha montado el dispositivo 10 para la medición de *Mycoplasma*.
(Medición de *Mycoplasma*)

Como control positivo, se ha usado una mezcla. Después de haber compuesto artificialmente los fragmentos de genes que codifican la proteína P1 (proteína de membrana) derivada de *Mycoplasma pneumoniae* (patógeno de la neumonía por micoplasma) y de haber añadido el ADN plasmídico incrustado en el vector pMD20T a una solución salina fisiológica para producir la mezcla. Como control negativo, se ha usado la propia solución salina fisiológica.

Se han aislado 150 [μl] de la muestra respectiva para ser añadidos a 550 [μl] de líquido de extracción que contiene sal caotrópica.

Se han goteado 110 [μl] del líquido extraído respectivo sobre la parte 101 de goteo de muestra del estuche superior 100 del dispositivo 10 montado para medición de *mycoplasma*. Después de haber confirmado que el líquido goteado había pasado y había sido absorbido completamente por el filtro 301, el filtro se ha insertado en el aparato de medición 700 dedicado.

5 El dispositivo 10 se inserta inclinado en un ángulo de aproximadamente 30 grados con respecto a la dirección horizontal mediante una guía del aparato de medición 700. Dentro del aparato de medición 700, el tubo de reacción 200 se coloca en el bloque de control de la temperatura 703 y la unidad de medición de la fluorescencia 704.

10 Después de eso, el primer elemento de presión 1 del aparato de medición 700 se mueve para deslizar el recipiente 120 de líquido de limpieza. De este modo, se rompe el sello de aluminio del recipiente 120 de líquido de limpieza para descargar el fluido de limpieza a la parte 101 de goteo de muestra.

15 El fluido de limpieza lava los genes capturados por las partículas de sílice en el filtro 301 para que sean absorbidos por el material absorbente 401 por debajo del filtro 301.

20 Después de que un sensor del nivel de líquido (no mostrado) del aparato de medición 700 haya confirmado que el fluido de limpieza se ha filtrado, el segundo elemento de presión 2 que se proyecta hacia dentro desde la abertura 602 del estuche inferior 600 se mueve para aplicar fuerza a la pieza de presión 503.

Después, el acoplamiento entre el miembro de bloqueo 502 de la placa 500 de soporte y los topes 601 y 601 se liberan, y la placa 500 de soporte se mueve. De esta manera, la placa 400 de instalación del material absorbente y el cuerpo 300 que soporta el filtro se cambian desde su estado fijo de unión por presión a un estado retirado móvil.

25 Después de eso, el tercer elemento de presión 3 empuja los nervios de conducción 303 y 303 para hacer que el cuerpo 300 que soporta el filtro se mueva hacia el extremo en el que el filtro 301 y la pieza 302 de aplicación del reactivo están insertados a presión en el reactivo 201 dentro del tubo de reacción 200.

30 Según una serie de operación mencionada anteriormente, el reactivo 2 de reacción predispensado, el reactivo 1 de reacción aplicado en la pieza 302 de aplicación del reactivo del cuerpo que soporta el filtro y el ADN de *Mycoplasma pneumoniae* conjugado con las partículas de sílice en el filtro 301 se mezclan todos juntos.

[Tabla 1]

Condiciones relativas al método de PCR		
Condición de reacción	Temperatura (°C)	Tiempo (seg)
Desnaturalización inicial	95	120
Reacción de amplificación (1 - 45 ciclos)	95	5
	70	15
2ª etapa de detección de diana	95	10
	42,5	20

35 Después de que se haya movido el tercer elemento de presión 3, el aparato de medición 700 aumenta/disminuye repetidamente la temperatura del bloque de control 703 de acuerdo con el perfil de temperatura mostrado en (la Tabla 1) para iniciar la PCR dentro del tubo de reacción 200 inmediatamente.

40 La figura 12 muestra un gráfico que muestra resultado de medición del control positivo y del control negativo en la realización según la presente invención.

Cuando una sonda "Q" se conjuga con un gen diana, apaga la luz. En consecuencia, se asume que la intensidad de fluorescencia se hace más pequeña a medida que avanzan los ciclos con respecto al control positivo.

45 Con respecto al control positivo de la figura 12, el apagado provocad por la amplificación del gen diana se observa desde los 28 ciclos vecinos. Por el contrario, con respecto al control negativo, el apagado no se observa hasta los 45 ciclos.

50 Como se ha discutido en detalle anteriormente, la presente invención se refiere al dispositivo para el método de amplificación de ácido nucleico disponible para transformar producto del cribado genético con respecto al diagnóstico *in vitro* en el modo de POCT.

55 El cribado genético general es un método de examen excelente tanto en sensibilidad como en especificidad. Sin embargo, el cribado genético general requiere aparatos de medición caros y la técnica experta, y se encuentra en un estado que puede ser desarrollado fácilmente para hospitales y/o por médicos practicantes de pequeña escala.

Por el contrario, al utilizar el dispositivo 10 según la presente invención, es suficiente gotear un líquido de muestra después de la extracción y únicamente ajustar el dispositivo para el aparato de medición 700 dedicado.

Dentro del dispositivo 10, es posible realizar las etapas de: capturar genes; lavarlos; la reacción de amplificación con respecto a los mismos; y detección de los mismos. También puede resolverse el problema de contaminación. Se logra una inspección muy simple y en poco tiempo. Debido al bajo coste del mismo, es probable que el dispositivo se desarrolle ampliamente en muchos escenarios médicos.

5

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 es un diagrama en perspectiva de un dispositivo para la reacción de amplificación del ácido nucleico cuando se gotea una muestra en una realización de la presente invención;

10 La figura 2 es un diagrama en perspectiva del aparato de medición en la realización de la presente invención;

La figura 3 es un plano de superficie que muestra el principio de un aparato de medición en la realización de la presente invención;

La figura 4 es una vista en perspectiva de despiece del dispositivo para la reacción de amplificación del ácido nucleico en la realización de la presente invención;

15 La figura 5(a) es un diagrama en perspectiva de un cuerpo que soporta el filtro en la realización de la presente invención;

La figura 5(b) es un diagrama en perspectiva de un recipiente de líquido de limpieza en la realización de la presente invención;

20 La figura 5(c) es un diagrama en perspectiva de una cubierta para el recipiente de líquido de limpieza en la realización de la presente invención;

La figura 6(a) es un primer diagrama explicativo de un primer elemento de presión en la realización de la presente invención;

La figura 6(b) es un segundo diagrama explicativo del primer elemento de presión en la realización de la presente invención;

25 La figura 6(c) es un tercer diagrama explicativo del primer elemento de presión en la realización de la presente invención;

La figura 7(a) es un primer diagrama explicativo del recipiente de líquido de limpieza en la realización de la presente invención de operación;

30 La figura 7(b) es un segundo diagrama explicativo del recipiente de líquido de limpieza en la realización de la presente invención de operación;

La figura 7(c) es un tercer diagrama explicativo del recipiente de líquido de limpieza en la realización de la presente invención de operación;

La figura 8(a) es un diagrama en perspectiva del cuerpo que soporta el filtro y el material absorbente en la realización de la presente invención;

35 La figura 8(b) es un diagrama en perspectiva de un estuche inferior y una placa de soporte en la realización de la presente invención;

La figura 9(a) es un primer diagrama explicativo de un soporte en la realización de la presente invención;

La figura 9(b) es un segundo diagrama explicativo del soporte en la realización de la presente invención;

40 La figura 10(a) es un primer diagrama explicativo del material absorbente en la realización de la presente invención;

La figura 10(b) es un segundo diagrama explicativo del material absorbente en la realización de la presente invención;

La figura 10(c) es un tercer diagrama explicativo del material absorbente en la realización de la presente invención;

La figura 10(d) es un cuarto diagrama explicativo del material absorbente en la realización de la presente invención;

La figura 10(e) es un quinto diagrama explicativo del material absorbente en la realización de la presente invención;

45 La figura 10(f) es un sexto diagrama explicativo del material absorbente en la realización de la presente invención;

La figura 11(a) es un primer diagrama de operación explicativo del cuerpo que soporta el filtro en la realización de la presente invención;

La figura 11(b) es un segundo diagrama de operación explicativo del cuerpo que soporta el filtro en la realización de la presente invención;

50 La figura 11(c) es un primer diagrama de operación explicativo del cuerpo que soporta el filtro en la realización de la presente invención; y

La figura 12 es un gráfico que muestra un resultado de medición con respecto a un control positivo y un control negativo en la realización de la presente invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS SÍMBOLOS

55

1: Primer elemento de presión

2: Segundo elemento de presión

3: Tercer elemento de presión

10: Dispositivo para reacción de amplificación de ácidos nucleicos

60

100: Estuche superior

101: Parte de goteo de muestras

101a: Puerto de descarga

101b: Aliviadero

102: Parte de manejo del dispositivo de reacción

65

103: Tope

110: Cubierta para recipiente de líquido de limpieza

- 111: Proyección de rotura
- 120: Recipiente del líquido de limpieza
- 121: Puesto de inyección
- 122: Proyección
- 5 200: Tubo de reacción
- 201: Reactivo
- 300: Cuerpo de soporte del filtro
- 301: Filtro
- 302: Pieza de aplicación del reactivo
- 10 303: Nervio de conducción
- 304: Junta tórica
- 400: Placa de instalación del material absorbente
- 401: Material absorbente
- 500: Placa de soporte
- 15 501: Soporte
- 502: Miembro de bloqueo
- 503: Pieza de presión
- 600: Estuche inferior
- 601: Tope
- 20 602: Abertura
- 700: Aparato de medición
- 701: Puerto de inserción
- 702: Pantalla del monitor
- 703: Bloque de control de temperatura
- 25 704: Unidad de medición de fluorescencia
- 704a: Iluminador
- 704b: Sensor de recepción de luz
- 705: Puerta
- 800: Boquilla de goteo
- 30 801: Contenedor de extracción
- 802: Mano

REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo (10) para la reacción de amplificación del ácido nucleico, que comprende:

- 5 un estuche (100, 600) con una superficie superior que incluye una parte de goteo de muestra (101) para recibir una muestra líquida que contiene ácido nucleico, siendo goteada la muestra líquida desde una boquilla (800);
 un tubo de reacción (200) que se proyecta hacia afuera desde un extremo del estuche (100, 600); que incluye un espacio de almacenaje en el mismo; y que está formado para que pueda instalarse dentro de un aparato de medición (700); en el que el tubo de reacción (200) contiene al menos una parte del reactivo requerido para la reacción de
 10 amplificación de ácidos nucleicos;
 un recipiente de limpieza (120) que porta fluido de limpieza en el mismo;
 un medio (111) que permite que el fluido de limpieza dentro del recipiente de líquido de limpieza (120) fluya hacia la parte de goteo de muestra (101);
 un filtro (301) configurado para portar en el mismo el ácido nucleico contenido en la muestra líquida; un cuerpo que
 15 soporta el filtro (300) almacenado dentro del estuche (100, 600) para soportar el filtro (301) de manera que el filtro (301) sea capaz de tomar:

una posición de contacto en la que el filtro (301) está en contacto con la muestra líquida justo por debajo de la parte de goteo de muestra (101); y

- 20 una posición de reacción en la que el filtro (301) está situado dentro del espacio de almacenaje del tubo de reacción (200); y

material absorbente (401) capaz de tomar:

- 25 una posición de unión a presión en donde el material absorbente (401) está unido mediante presión al filtro (301) en la posición de contacto de modo que el filtro (301) absorbe la muestra líquida en contacto con el mismo; y
 una posición de separación en donde el material absorbente (401) se retira desde la posición de unión a presión de modo que el filtro (301) puede moverse libremente.

- 30 2. El dispositivo (10) para la reacción de amplificación del ácido nucleico, según se define en la reivindicación 1, en el que una parte de presión (3) impulsa el cuerpo que soporta el filtro (300) para que sea soportado de modo que el cuerpo que soporta el filtro (300) pueda moverse desde la posición de contacto a la posición de reacción.

- 35 3. El dispositivo (10) para la reacción de amplificación del ácido nucleico, según se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que el tubo de reacción (200) está compuesto de un material transparente.

- 40 4. El dispositivo (10) para la reacción de amplificación del ácido nucleico, según se define en la reivindicación 1, en el que al menos parte de reactivo requerido para la reacción de amplificación del ácido nucleico contiene compuesto polimérico de fusión por calor que se solidifica y/o gelifica antes de la reacción de amplificación del ácido nucleico, y que se calienta para volverse líquido en la reacción de amplificación del ácido nucleico, estando contenido al menos parte de reactivo dentro del tubo de reacción (200).

- 45 5. El dispositivo (10) para la reacción de amplificación del ácido nucleico, según se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el material absorbente (401) está compuesto de un material blando absorbente de agua que incluye: papel de filtro; un material polimérico absorbente; y un papel de filtro de fibra de vidrio.

6. El dispositivo (10) para la reacción de amplificación del ácido nucleico, según se define en la reivindicación 1, en el que una partícula de sílice está fija al filtro (301).

- 50 7. El dispositivo (10) para la reacción de amplificación del ácido nucleico, según se define en la reivindicación 1, en el que el filtro (301) está compuesto de una membrana polimérica.

8. El dispositivo (10) para la reacción de amplificación del ácido nucleico, según se define en la reivindicación 7, en el que el filtro (301) está compuesto de PTFE hidrófilo (politetrafluoroetileno).

- 55 9. El dispositivo (10) para la reacción de amplificación del ácido nucleico, según se define en la reivindicación 1, en el que el cuerpo que soporta el filtro (300) contiene al menos una parte del reactivo requerido para la reacción de amplificación del ácido nucleico.

Fig. 1

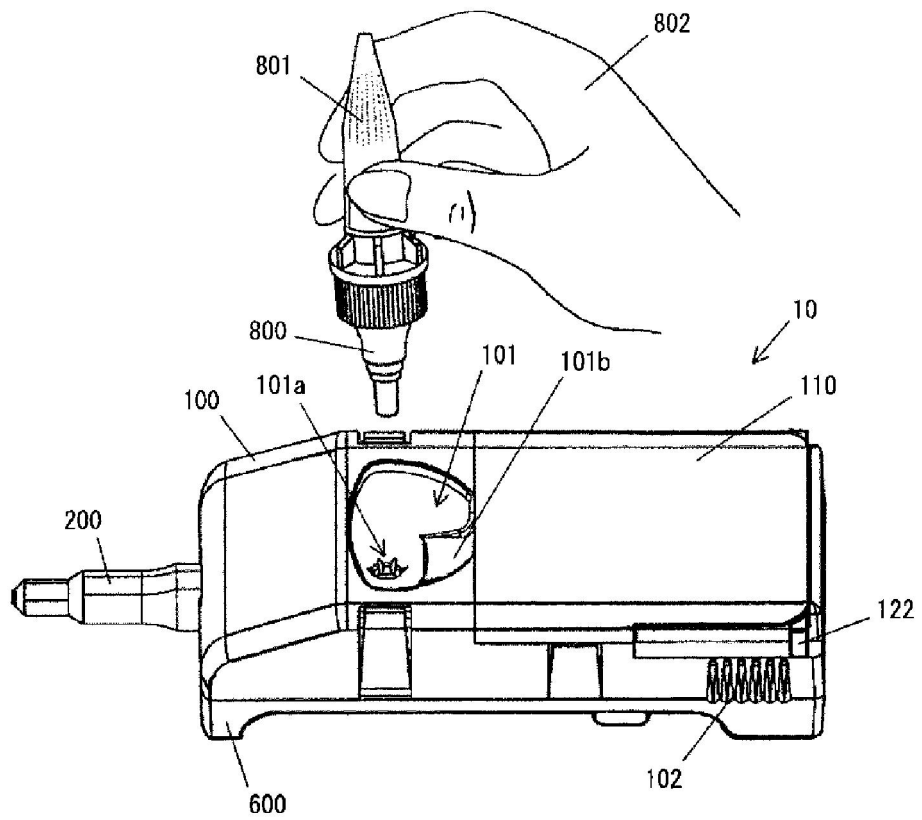


Fig. 2

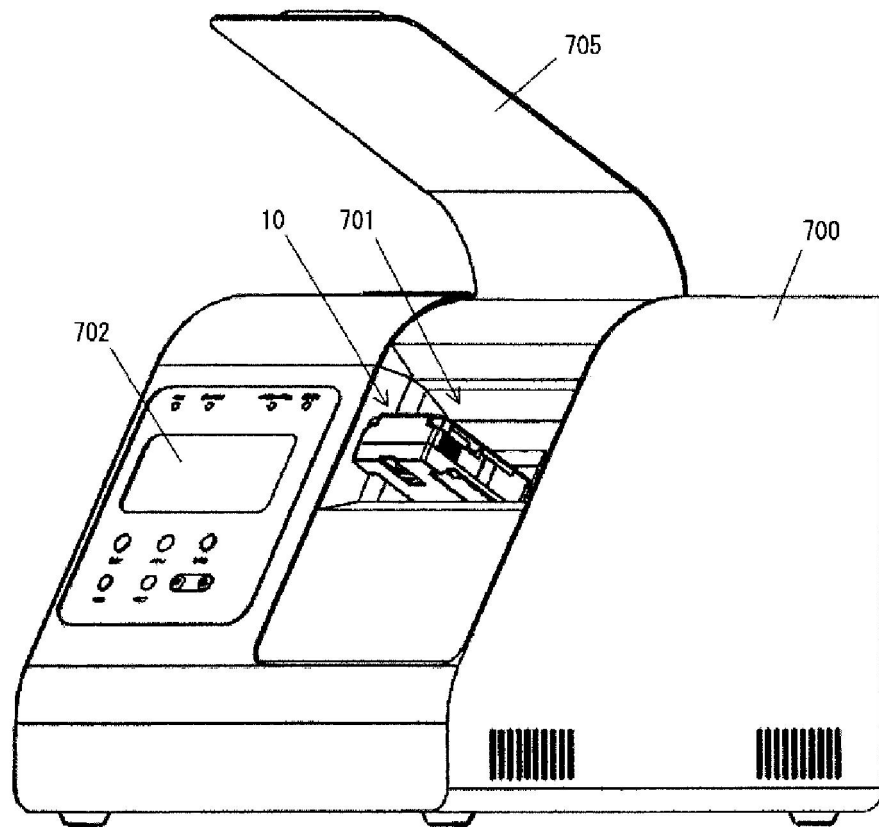


Fig. 3

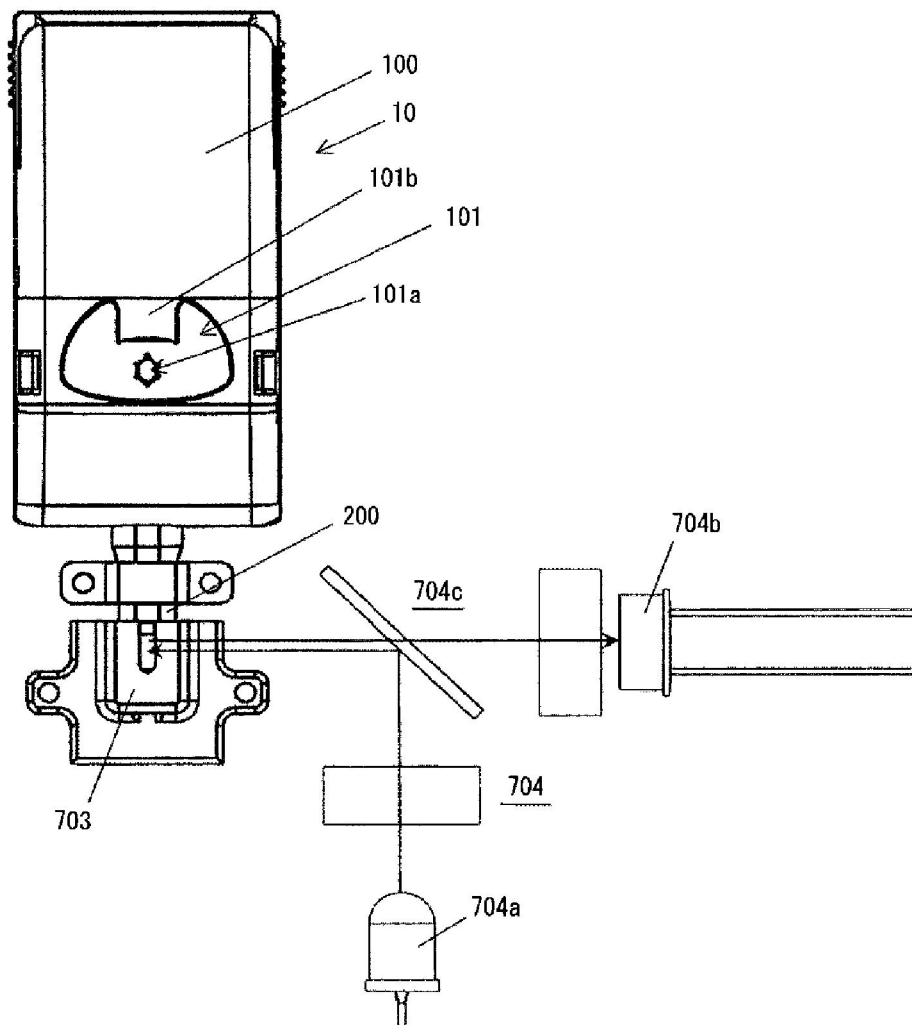


Fig. 4

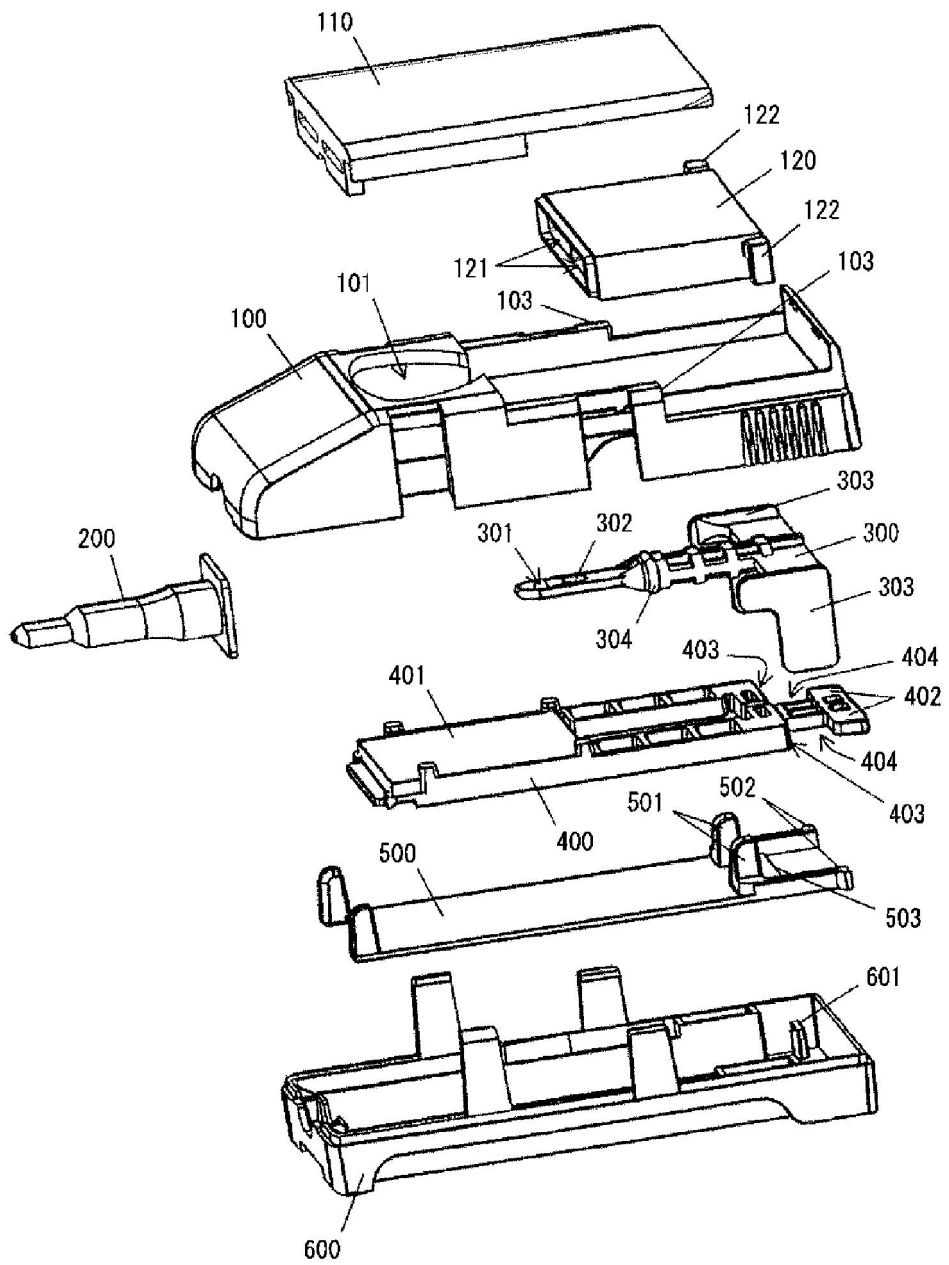


Fig. 5

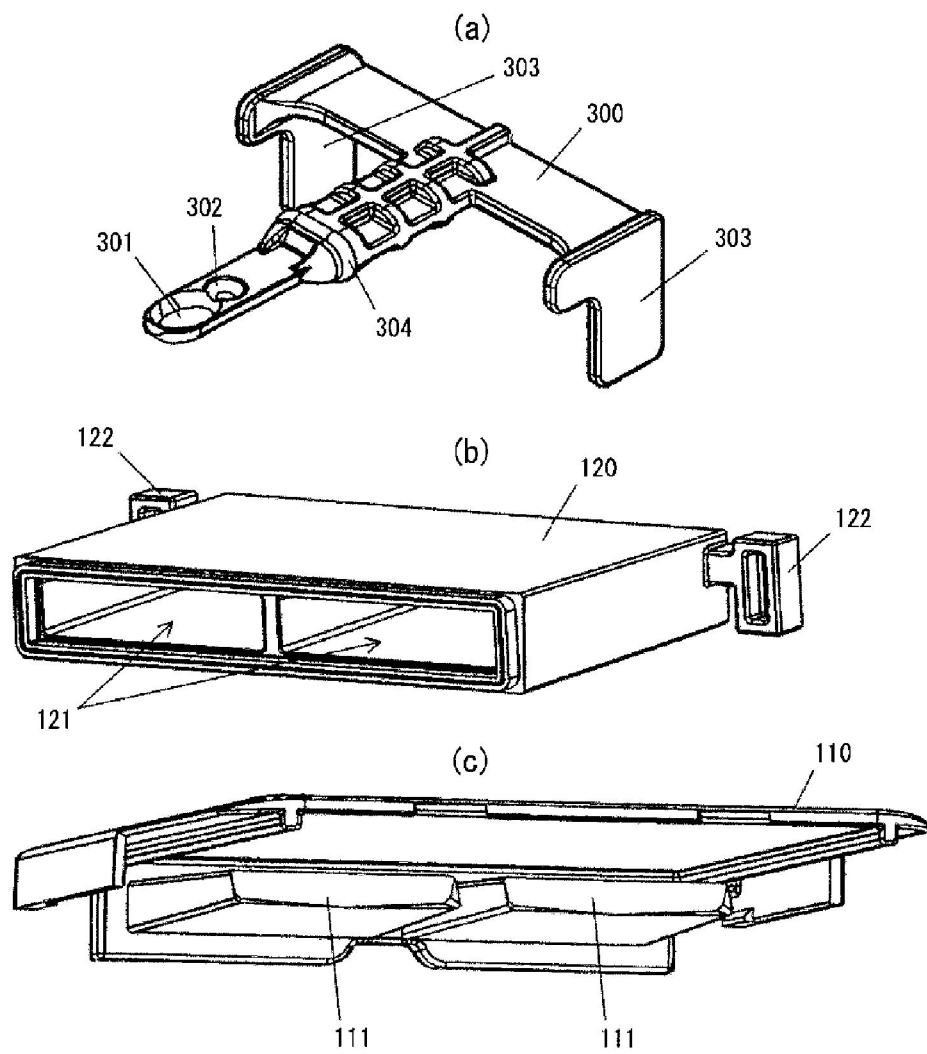


Fig. 6

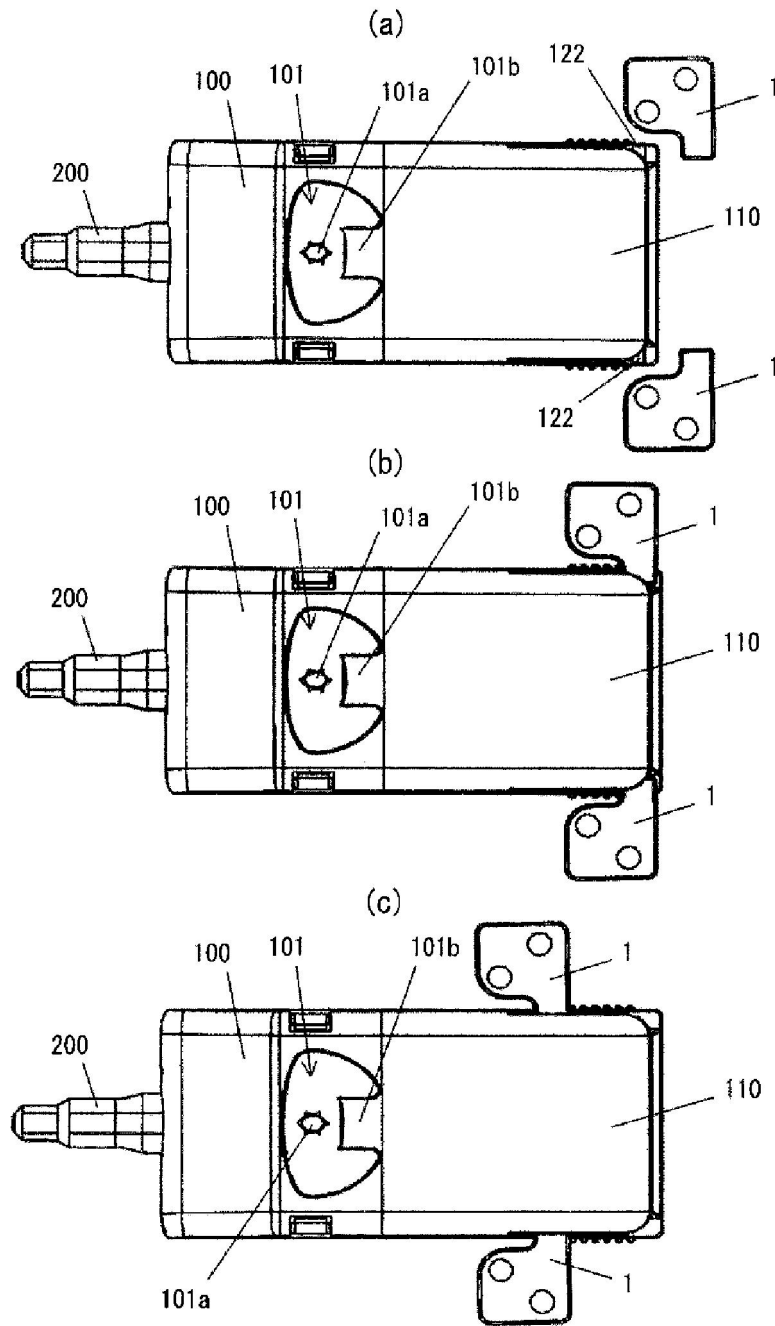


Fig. 7

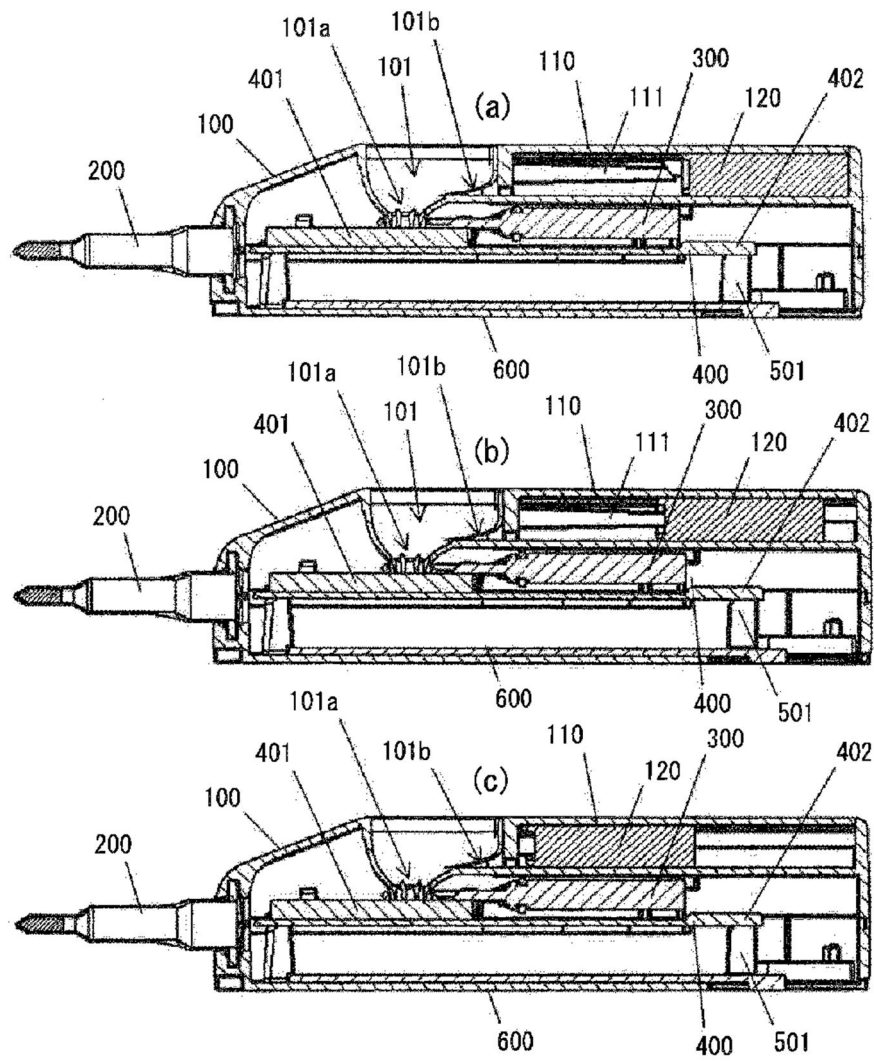


Fig. 8

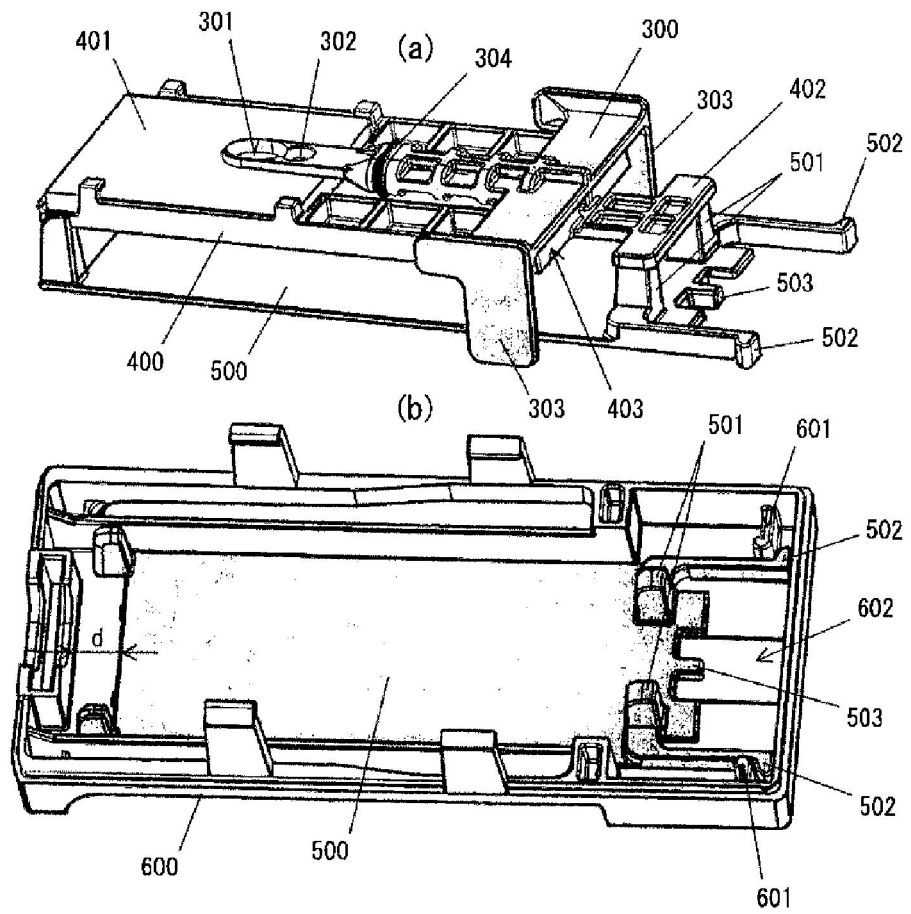


Fig. 9

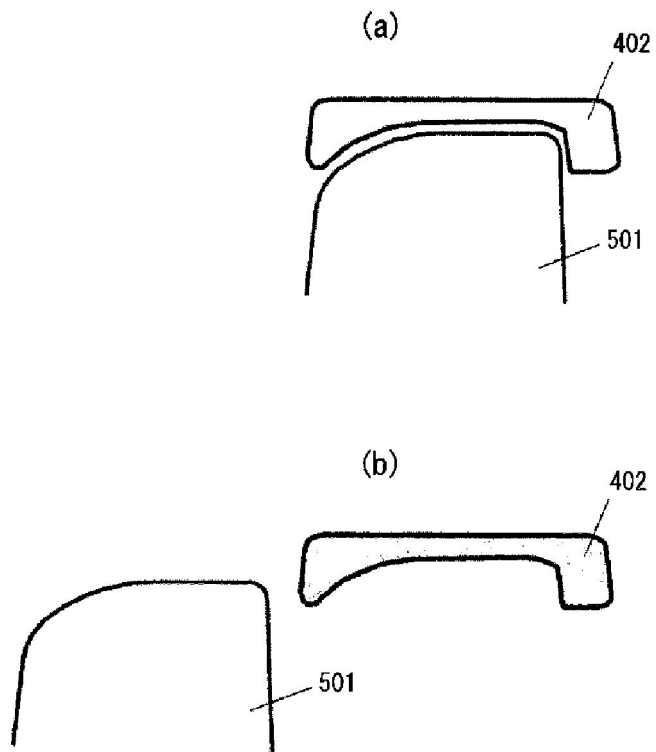


Fig. 10

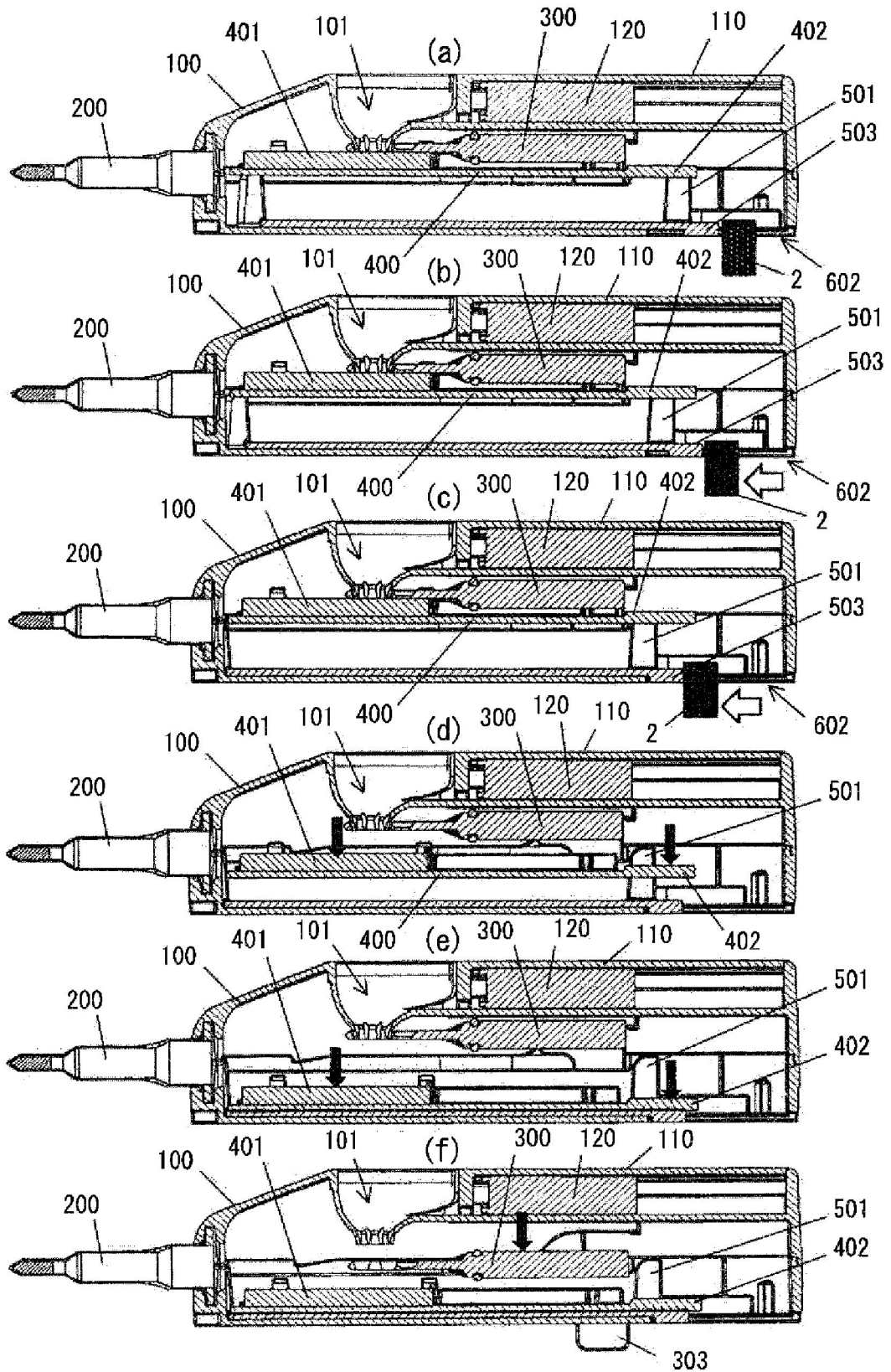


Fig. 11

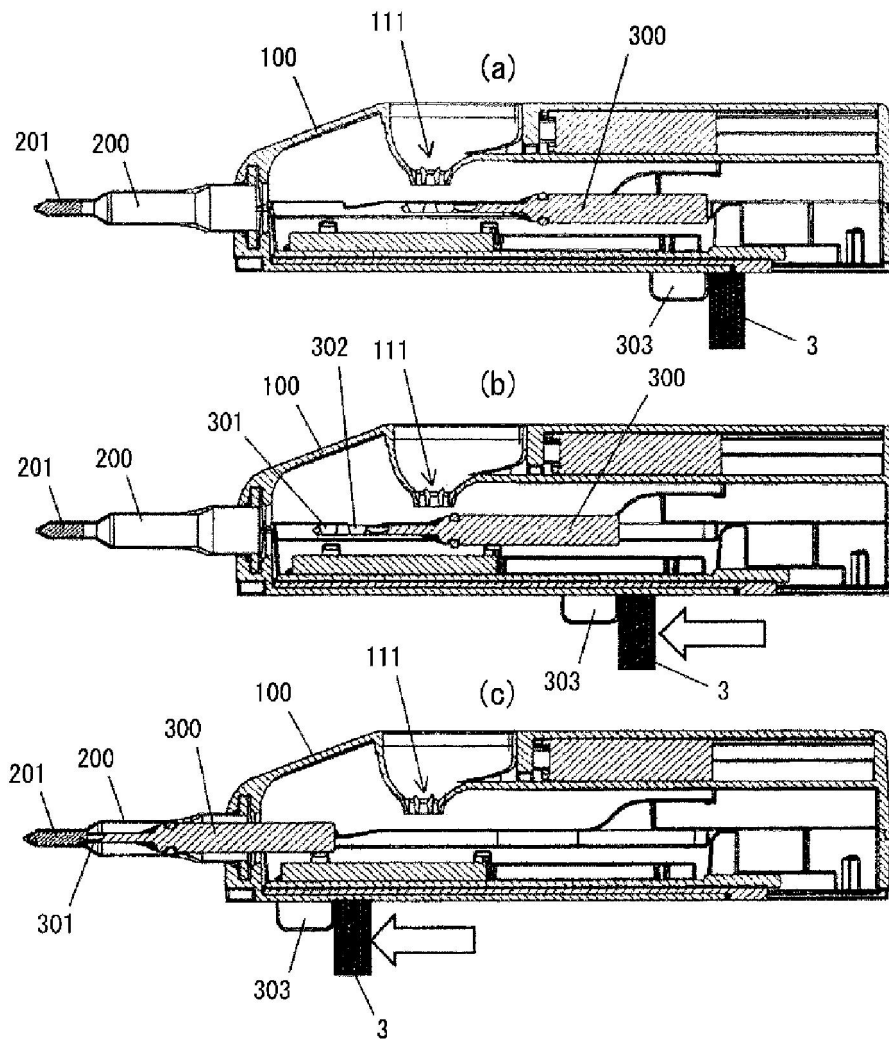


Fig. 12

