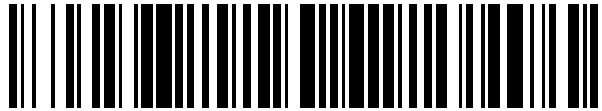


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 457 918**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.01.2007 E 07001600 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.04.2014 EP 1813682**

54 Título: **Aparato y método de amplificación de ácido nucleico**

30 Prioridad:

27.01.2006 JP 2006018371

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

29.04.2014

73 Titular/es:

**SYSMEX CORPORATION (100.0%)
5-1, Wakinohama-Kaigandori 1-chome, Chuo-ku
Kobe-shi
Hyogo 651-0073, JP**

72 Inventor/es:

**AKAI, YASUMASA;
NAKABAYASHI, KADZUKI y
TANOSHIMA, EIJI**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 457 918 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

Aparato y método de amplificación de ácido nucleico

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un aparato y método de amplificación de ácido nucleico y más en concreto, a un aparato y método de amplificación de ácido nucleico capaces de amplificar y medir un ácido nucleico deseado en una muestra derivada de un organismo vivo.

10

Antecedentes

En los últimos años, la prueba genética se ha venido usando rápida y ampliamente en el campo del diagnóstico clínico. Con la prueba genética, los ácidos nucleicos y los cromosomas son analizados para poder examinar la presencia o ausencia de variaciones y formas nucleares asociadas con trastornos hereditarios a efectos clínicos. Como un ejemplo de prueba genética se menciona el diagnóstico de metástasis de células cancerosas a nodos linfáticos. Las células cancerosas dejan tumor primario y se difunden por metástasis por todo el cuerpo del paciente mediante los vasos sanguíneos y conductos linfáticos. En la operación de un cáncer, las lesiones se deberán quitar con la mayor seguridad posible, y por lo tanto, la metástasis deberá ser detectada exactamente y se deberá dar tratamientos apropiados dependiendo del grado de metástasis. En este sentido, el diagnóstico de metástasis de células cancerosas a nodos linfáticos realizado durante la operación tiene un significado sumamente importante. Como uno de los métodos de diagnóstico de metástasis de células cancerosas a nodos linfáticos, se conoce un método en el que ácido nucleico de una proteína, que no se expresa en células normales o cuyo nivel de expresión es bajo, pero que se expresa mucho en células cancerosas, es detectado como un ácido nucleico deseado. Gracias al avance de la tecnología de análisis genético realizado en estos años, ahora es posible realizar diagnóstico de cáncer efectivamente detectando un ácido nucleico deseado contenido en el tejido de nodo linfático reseccionado del organismo vivo mediante amplificación.

Como se ha mencionado anteriormente, cuando se desea determinar si hay metástasis de células cancerosas a nodos linfáticos por amplificación de ácido nucleico deseado, se lleva a cabo amplificación de ácidos nucleicos deseados en una muestra de medición usando una muestra de medición que se prepara de tal manera que los nodos linfáticos sean homogenizados y los ácidos nucleicos deseados sean extraídos a una solución y purificados. Sin embargo, con este método, existe el inconveniente de que la purificación del ácido nucleico deseado precisa un tiempo considerable, tarda más tiempo antes de que los resultados de la determinación por amplificación del ácido nucleico deseado estén disponibles, y es difícil realizar rápidamente el diagnóstico de metástasis de células cancerosas por amplificación del ácido nucleico deseado. En el diagnóstico de metástasis de células cancerosas a nodos linfáticos durante la operación, la estrategia de tratamiento en la operación se determina según los resultados de la determinación de metástasis de células cancerosas, y por lo tanto, la rápida determinación de metástasis es tan importante.

Desde los puntos de vista mencionados anteriormente, si una solución en la que los nodos linfáticos están homogenizados o se usa supernadante de esta solución como la muestra de medición sin efectuar extracción y purificación del ácido nucleico al tiempo de la preparación de la muestra de medición, es posible realizar mediciones del ácido nucleico deseado de forma rápida. Sin embargo, cuando el ácido nucleico deseado es amplificado usando dicha muestra de medición, existe el problema de que, en comparación con un caso donde la amplificación de ácidos nucleicos se realiza usando una muestra de medición preparada por purificación del ácido nucleico, la cantidad de sustancias inhibitoras que evitan la amplificación del ácido nucleico deseado derivado de nodos linfáticos aumenta y así no se puede obtener resultados exactos de la medición.

Con el fin de superar este problema, convencionalmente, se conoce un método en el que se estima la amplificación de un ácido nucleico deseado usando una sonda de ácido nucleico que hibridiza al ácido nucleico deseado (véase, por ejemplo, la publicación de la solicitud de patente japonesa número 2004-203). Según el método descrito en la publicación de la solicitud de patente japonesa número 2004-203, un ácido nucleico (ácido nucleico estándar interno) en el que la secuencia base del ácido nucleico deseado se muta en parte, se añade a un sistema de medición en una concentración conocida, y al mismo tiempo, una sonda de ácido nucleico deseado que hibridiza específicamente al ácido nucleico deseado y una sonda de ácido nucleico estándar interno que hibridiza específicamente al ácido nucleico estándar interno se añaden al sistema de medición, el ácido nucleico deseado y el ácido nucleico estándar interno se miden entonces a la vez usando el método PCR, y el ácido nucleico deseado se mide a partir de una cantidad de adición del ácido nucleico estándar interno.

Sin embargo, con el método para medir el ácido nucleico deseado descrito en dicha publicación de la solicitud de patente japonesa número 2004-203, el ácido nucleico estándar interno no exhibe necesariamente la misma reactividad que el ácido nucleico deseado, y por lo tanto, surge el problema de que la medición exacta del ácido nucleico deseado es difícil.

La técnica anterior también incluye la solicitud de patente EP 1508809 A1, que describe un aparato para

amplificación incluyendo una unidad de determinación. Además, Dumonceaux y colaboradores, "Enumeration of specific bacterial populations in complex intestinal communities using quantitative PCR based on the chaperonin-60 target", Journal of Microbiological Methods 64(1):46-62 describe un método para evitar que los inhibidores PCR copurificados deterioren los límites de detección en un ensayo qPCR de muestras de ADN de poblaciones bacterianas, incluyendo plantilla endógena de amplificación en una serie de dilución del extracto de ADN.

Resumen

El alcance de la presente invención se define únicamente por las reivindicaciones anexas, y no queda afectado en ningún grado por lo expresado en este resumen.

Un aparato de amplificación de ácido nucleico según un primer aspecto de la presente invención es un aparato de amplificación de ácido nucleico para amplificar un ácido nucleico deseado derivado de organismo vivo, incluyendo: una unidad de medición para amplificar el ácido nucleico deseado en una muestra de medición preparada a partir del organismo vivo, y medir un producto de la amplificación del ácido nucleico deseado; una unidad de obtención de valor de medición para obtener un valor de medición relacionado con una cantidad del producto de la amplificación; y una unidad de determinación para determinar si la inhibición de amplificación del ácido nucleico deseado tiene lugar o no en base a un primer valor de medición y un segundo valor de medición, teniendo el primer valor de medición obtenido de una primera muestra de medición y el segundo valor de medición obtenido de una segunda muestra de medición una relación de dilución diferente de la primera muestra de medición.

Un método de amplificación de ácido nucleico según un segundo aspecto de la presente invención es un método de amplificación de ácido nucleico para amplificar un ácido nucleico deseado derivado de organismo vivo, incluyendo los pasos de: amplificar el ácido nucleico deseado en una primera muestra de medición preparada a partir del organismo vivo; amplificar el ácido nucleico deseado en una segunda muestra de medición preparada a partir del organismo vivo y que tiene una relación de dilución diferente de la primera muestra de medición; medir un primer producto de la amplificación del ácido nucleico deseado de la primera muestra de medición; medir un segundo producto de la amplificación del ácido nucleico deseado de la segunda muestra de medición; obtener un primer valor de medición relacionado con una cantidad del primer producto de la amplificación; obtener un segundo valor de medición relacionado con una cantidad del segundo producto de la amplificación; y determinar si la inhibición de amplificación del ácido nucleico deseado tiene lugar o no en base al primer valor de medición y el segundo valor de medición.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es una ilustración en perspectiva que muestra toda la composición de un sistema de amplificación y análisis de genes de una realización según la presente invención.

La figura 2 es una ilustración en perspectiva que muestra toda la composición de un aparato de medición y amplificación de genes del sistema de amplificación y análisis de genes de una realización representada en la figura 1.

La figura 3 es una vista esquemática en planta de la figura 2.

La figura 4 es un dibujo que representa una pantalla de navegador de datos presentada en la unidad de visualización de un ordenador personal que compone el sistema de amplificación y análisis de genes de una realización representada en la figura 1.

La figura 5 es un dibujo que representa la relación entre resultados de la medición del espécimen de muestra, resultados de la medición de la muestra de dilución, y la existencia o inexistencia del gen deseado.

La figura 6 es un gráfico que muestra la relación entre tasa y concentración de dilución de espécimen de muestra que produjo inhibición de amplificación.

La figura 7 es un dibujo que representa una pantalla de lista de carga de trabajo presentada en la unidad de presentación del ordenador personal que compone el sistema de amplificación y análisis de genes de una realización representada en la figura 1.

La figura 8 es un dibujo que representa una pantalla de presentación de curva analítica presentada en la unidad de visualización del ordenador personal que compone el sistema de amplificación y análisis de genes de una realización representada en la figura 1.

La figura 9 es una vista esquemática en planta que representa la variación del aparato de medición y amplificación de genes del sistema de amplificación y análisis de genes de una realización representada en la figura 1.

La figura 10 es un diagrama de flujo que representa el flujo de determinación de inhibición de amplificación de CPU

del ordenador personal del sistema de amplificación y análisis de genes de una realización representada en la figura 1. La figura 1 es una vista en planta que muestra toda la composición de un aparato de análisis inmunológico equipado con un aparato de suministro de chips de pipeta de una realización según la presente invención.

5 Descripción detallada de la realización preferida

Ahora, se explicarán a continuación realizaciones de la presente invención con referencia a los dibujos.

10 Un sistema de amplificación y análisis de genes 1 según la presente realización es un sistema que soporta diagnóstico de metástasis de cáncer para tejido reseccionado (nodo linfático) en operación de cáncer, donde el gen deseado (mRNA) originado a partir de cáncer existente en el tejido reseccionado es amplificado por el método LAMP (Amplificación isotérmica mediada por bucle, Eiken Chemical Co., Ltd.), y turbidez blanca debida a pirofosfato de magnesio, que es generada por amplificación, se mide por turbidimetría para saber si el gen deseado está o no presente a un nivel predeterminado o más. Mientras tanto, se describen detalles del método LAMP en la Patente de Estados Unidos número 6410278.

20 El sistema de amplificación y análisis de genes 1 de la presente realización incluye, como se representa en la figura 1, un aparato de medición y amplificación de genes 101 y un ordenador personal (PC) 10² conectado con el fin de permitir la comunicación con el aparato de medición y amplificación de genes 101 por cable o de forma inalámbrica.

25 En primer lugar, se explicarán detalles del aparato de medición y amplificación de genes 101 con referencia a las figuras 1 a 3. El aparato de medición y amplificación de genes 101 incluye, como se representa en las figuras 2 y 3, un mecanismo dispensador 10, una unidad de colocación de espécimen de muestra 20, una unidad de colocación de chips 30, una unidad de desecho de chips 40, y una unidad de detección de reacción 50 incluyendo cinco bloques de detección de reacción 50a, y una unidad de transferencia 60 para transferir el mecanismo dispensador 10 en la dirección del eje X y la dirección del eje Y.

30 Además, el mecanismo dispensador 10 incluye, como se representa en las figuras 2 y 3, una porción de brazo 11 que es movida en la dirección del eje X y la dirección del eje Y (dirección horizontal) por la unidad de transferencia 60, y una unidad de jeringa doble (dos) 12 cada una capaz de moverse independientemente en la dirección del eje Z (dirección vertical) con respecto a la porción de brazo 11.

35 Además, como se representa en las figuras 2 y 3, en la unidad de colocación de espécimen de muestra 20 se ha dispuesto, secuencialmente desde la parte delantera del aparato, diez agujeros de colocación de recipiente de muestra 21a a 21j, un agujero de colocación de recipiente de reactivo de enzima 21k y un agujero de colocación de recipiente de reactivo iniciador 21l. Además, diez agujeros de colocación de recipiente de muestra 21a a 21j se han dispuesto en cinco líneas y dos filas. Y los agujeros de colocación de recipiente de muestra 21c y 21d, los agujeros de colocación de recipiente de muestra 21e y 21f, los agujeros de colocación de recipiente de muestra 21g y 21h, los agujeros de colocación de recipiente de muestra 21i y 21j se han dispuesto, secuencialmente desde la parte trasera del aparato, en la posición de colocación de muestra 1, la posición de colocación de muestra 2, la posición de colocación de muestra 3, y la posición de colocación de muestra 4.

45 Además, según la presente realización, en los agujeros de colocación de recipiente de muestra 21c, 21e, 21g y 21i a la izquierda de la parte delantera, se ha puesto un recipiente de muestra 22 en el que se aloja líquido de extracción por solubilización (especimen de muestra), producido con anterioridad por tratamiento (homogenización, filtración o análogos) de un tejido vivo reseccionado (nodo linfático), y en los agujeros de colocación de recipiente de muestra 21d, 21f, 21h y 21j a la derecha de la parte delantera se ha puesto un recipiente de muestra 23 en el que se aloja cada una de las muestras de dilución (dilución a diez veces) de dichos especímenes de muestra. Específicamente, una muestra de dilución correspondiente a un espécimen de muestra alojado en el recipiente de muestra 22 que se ha de poner en el agujero de colocación de recipiente de muestra 21c se aloja en un recipiente de muestra 23 del agujero de colocación de recipiente de muestra 21d. Además, una muestra de dilución correspondiente a un espécimen de muestra alojado en el recipiente de muestra 22 que se ha de poner en el agujero de colocación de recipiente de muestra 21e se aloja en un recipiente de muestra 23 del agujero de colocación de recipiente de muestra 21f, una muestra de dilución correspondiente a un espécimen de muestra alojado en el recipiente de muestra 22 que se ha de poner en el agujero de colocación de recipiente de muestra 21g se aloja en un recipiente de muestra 23 del agujero de colocación de recipiente de muestra 21h, una muestra de dilución correspondiente a un espécimen de muestra alojado en el recipiente de muestra 22 que se ha de poner en el agujero de colocación de recipiente de muestra 21i se aloja en un recipiente de muestra 23 del agujero de colocación de recipiente de muestra 21j. En otros términos, se producen dos muestras (especimen de muestra, muestra de dilución) a partir de un tejido vivo. Mientras tanto, en la presente realización, muestras no purificadas (el ácido nucleico deseado no está purificado) se usan como el espécimen de muestra y la muestra de dilución.

60 Además, un recipiente 24, en el que se aloja un control positivo para confirmar que un gen a amplificar ha sido amplificado normalmente, está colocado en el agujero de colocación de recipiente de muestra 21a y, al mismo tiempo, un recipiente 25, en el que se aloja un control negativo para confirmar que un gen a no amplificar no ha sido amplificado normalmente, se pone en un agujero de colocación de recipiente de muestra 21b.

En un agujero de colocación de recipiente de reactivo de enzima 21k y en un agujero de colocación de recipiente de reactivo iniciador 21l se pone un recipiente de reactivo de enzima 26 que aloja DNA polimerasa y enzima de transferencia inverso como un reactivo de enzima y un recipiente de reactivo iniciador 27 que aloja reactivo iniciador de CK19, respectivamente.

Además, como se representa en la figura 3, dos racks 32 teniendo cada uno un agujero de alojamiento 32a capaz de acomodar 36 piezas de chips de pipeta 31 están insertados soltamente en la unidad de colocación de chips 30. Se ha colocado dos botones de extracción 33 en la unidad de colocación de chips 30. Pulsando el botón de extracción 33, los racks 32 se ponen en estado extraíble.

Como se representa en la figura 3, dos agujeros de desecho de chips 40a para el desecho del chip de pipeta usado 31 se han colocado en la unidad de desecho de chips 40. Además, una porción de ranura 40b que tiene una anchura más pequeña que el agujero de desecho de chips 40a se ha colocado de manera que continúe al agujero de desecho de chips 40a.

Además, como se representa en las figuras 2 y 3, cada uno de los bloques de detección de reacción 50a de la unidad de detección de reacción 50 incluye una unidad de reacción 51, dos unidades de detección de turbidez 52 y un mecanismo de cierre de cubierta 53 (véase la figura 3). Como se representa en la figura 3, en la unidad de reacción 51 dispuesta en cada uno de los bloques de detección de reacción 50a se ha colocado dos agujeros de colocación de célula de detección 51a para poner una célula de detección 54. Cada uno de los bloques de detección de reacción 50a está dispuesto, secuencialmente desde la parte trasera del aparato, en la posición de colocación de célula 1, la posición de colocación de célula 2, la posición de colocación de célula 3, la posición de colocación de célula 4, y la posición de colocación de célula 5.

Además, las unidades de detección de turbidez 52 incluyen, como se representa en la figura 3, una fuente de luz LED 52a incluyendo LED azul que tiene una longitud de onda de 465 nm, que está montado en un sustrato 55a dispuesto en una cara lateral de la unidad de reacción 51, y una unidad de recepción de luz de fotodiodo 52b que está montada en un sustrato 55b dispuesto en otra cara lateral de la unidad de reacción 51. Un conjunto de unidades de detección de turbidez 52, incluyendo cada una una fuente de luz LED 52a y una unidad de recepción de luz de fotodiodo 52b, está dispuesto en dos conjuntos en cada uno de los bloques de detección de reacción 50a. Por lo tanto, la unidad de detección de turbidez 52, incluyendo un total de diez conjuntos de fuentes de luz LED 52a y unidades de recepción de luz de fotodiodo 52b, está dispuesta para cinco bloques de detección de reacción 50a. La fuente de luz LED 52a y la unidad de recepción de luz de fotodiodo 52b correspondiente están dispuestas de modo que una luz de aproximadamente 1 mm de diámetro sea irradiada desde la fuente de luz LED 52a a la parte inferior de la célula de detección 54 y esta luz podría ser recibida por la unidad de recepción de luz de fotodiodo 52b. Con el uso de la intensidad de la luz recibida por la unidad de recepción de luz de fotodiodo 52b, la presencia o la ausencia de la célula de detección 54 puede ser detectada y la turbidez del líquido alojado dentro de la unidad de célula 54a de la célula de detección 54 puede ser supervisada por una unidad de visualización 102c del ordenador personal 102, que se describirá más tarde. Específicamente, cuando la célula de detección 54 se pone en el agujero de colocación de célula de detección 51a, dado que la célula de detección 54 se coloca entre la fuente de luz LED 52a y la unidad de recepción de luz de fotodiodo 52b, la luz recibida por la unidad de recepción de luz de fotodiodo 52b es más débil que en el caso donde la célula de detección 54 no se pone. Ahora es posible detectar que la célula de detección 54 se ha puesto.

Además, la célula de detección 54 tiene dos unidades de célula 54a para acomodar el espécimen de muestra y la muestra de dilución, y dos unidades de cubierta 54b para cubrir dos unidades de célula 54a.

Además, la unidad de transferencia 60 incluye, como se representa en las figuras 2 y 3, una guía de operación directa 61 y un tornillo de bola 62 para transferir el mecanismo dispensador 10 en la dirección del eje Y, un motor paso a paso 63 para mover el tornillo de bola 62, una guía de operación directa 64 y un tornillo de bola 65 para transferir el mecanismo dispensador 10 en la dirección del eje X, un motor paso a paso 66 para mover el tornillo de bola 65. Mientras tanto, las transferencias del mecanismo dispensador 10 en la dirección del eje X y en la dirección del eje Y son realizadas haciendo girar el tornillo de bola 62 y 65 con el motor paso a paso 63 y 66, respectivamente.

El ordenador personal 102 incluye, como se representa en la figura 1, un teclado 102a y un ratón 102b que sirven como el dispositivo de entrada, incluyendo la unidad de visualización 102c un monitor, y una CPU 102d para analizar resultados de la medición del espécimen de muestra y la muestra de dilución. A continuación, con referencia a la figura 1 y las figuras 4 a 8, se explicarán detalles de la disposición de la pantalla de la unidad de visualización 102c del ordenador personal 102.

La unidad de visualización 102c se facilita para presentar una pantalla (pantalla de navegador de datos) para presentar los resultados de la medición del espécimen de muestra analizados por la CPU 102d, una pantalla (pantalla de lista de carga de trabajo) para dar instrucciones de medición tal como registro de la ID de la muestra usando el teclado 102a y el ratón 102b, y una pantalla (pantalla de presentación de curva analítica) para presentar la curva analítica, o análogos.

En la pantalla de navegador de datos, como se representa en la figura 4, se presenta una barra de herramientas 111 que presenta botones para ejecutar varias funciones tales como una función de ayuda, una unidad de presentación de información de muestra 112 para presentar diversa información del espécimen de muestra, y una unidad de presentación de resultados de medición 113 para indicar los resultados de la medición del espécimen de muestra que se presentan en la unidad de presentación de información de muestra 112.

Además, en la unidad de presentación de información de muestra 112 se facilita una columna de presentación de número de lote 112a, una columna de presentación de posición de muestra 112b, una columna de presentación de ID de muestra 112c, una columna de presentación de comentario 112d, una columna de presentación de fecha de medición 112e, y una columna de presentación de hora de medición 112f. La columna de presentación de número de lote 112a representa qué procesado de número de lote está teniendo lugar. Mientras tanto, procesado de lote significa que una pluralidad de especímenes de muestra y muestras de dilución son procesados colectivamente (en la presente realización, un máximo de cuatro especímenes de muestra y un máximo de cuatro muestras de dilución). En la columna de presentación de número de lote 112a, se muestra un número que indica el número de veces de procesado de lote ejecutado después del suministro de potencia más "1" ("5" en la pantalla). En la columna de presentación de posición de muestra 112b se presenta la posición de colocación de muestra donde se está poniendo el espécimen de muestra ("4" en la pantalla). En la columna de presentación de ID de muestra 112c y la columna de presentación de comentario 112d se presentan, respectivamente, comentarios para ID de muestra del espécimen de muestra introducido en la pantalla de lista de carga de trabajo que se describirá más tarde ("Muestra 02" en la pantalla) y para el espécimen de muestra (muestra de dilución) (en blanco en la pantalla). Además, en la columna de presentación de fecha de medición 112e y la columna de presentación de hora de medición 112f se presentan la fecha de medición del espécimen de muestra y la muestra de dilución ("2005/09/26" en la pantalla) y la hora ("12:53:06" en la pantalla).

Además, en la unidad de presentación de resultados de medición 113 se facilita un gráfico 113a que muestra la relación entre turbidez del espécimen de muestra identificado a partir de dicha columna de presentación de número de lote 112a y la columna de presentación de posición de muestra 112b y tiempo (min), columna de presentación de tiempo de subida de amplificación 113b, columna de presentación de medición de concentración 113c, y columna de presentación de resultado de determinación 113d. Mientras tanto, según la presente realización, los resultados de la medición de la muestra de dilución (gráfico, tiempo de subida de amplificación, medición de concentración y resultados de la determinación) se ponen de modo que usuarios distintos del administrador no los puedan ver. Como resultado, es posible eliminar la posibilidad de que los usuarios puedan considerar el resultado de medición de la muestra de dilución como resultado de medición del espécimen de muestra.

Además, en la columna de presentación de tiempo de subida de amplificación 113b se presenta el tiempo correspondiente a la turbidez 0,1 en el eje vertical del gráfico 113a ("10,7" en la pantalla).

Además, según la presente realización, en la columna de presentación de medición de concentración 113c, se presenta la concentración o el rango de concentración del espécimen de muestra calculado a partir del tiempo de subida (= 10,7) (min) presentado en la columna de presentación de tiempo de subida de amplificación 113b (" $< 2,5E + 02$ " en la pantalla) (copias/ μ l). Específicamente, la concentración se calcula a partir del tiempo de subida de amplificación (=10,7) en base a la curva analítica (véase la figura 8) que es una función lineal del tiempo de subida de amplificación y la concentración preparada por un calibrador medido con anterioridad. Cuando la concentración no es inferior a $2,5 \times 10^2$ (copias/ μ l), la concentración realmente medida se presenta dentro del rango de certeza de linealidad " $2,5E + 07$ copias/ μ l", y cuando es inferior a $2,5 \times 10^2$ (copias/ μ l) se presenta " $< 2,5E + 02$ ". Cuando se supera el rango de certeza de linealidad " $2,5E + 07$ copias/ μ l", se presenta " $> 2,5E + 07$ ".

Según la presente realización, la columna de presentación de resultado de determinación 113d se facilita para presentar el resultado de si un gen deseado (mRNA) está o no presente a un nivel predeterminado o más en el espécimen de muestra (positivo "+", negativo "-") en base al resultado de medición (concentración) del espécimen de muestra, y el resultado de medición (concentración) de su muestra de dilución. Además, la columna de presentación de resultado de determinación 113d se facilita para presentar información acerca de la inhibición de amplificación del gen deseado (mRNA) en el espécimen de muestra conjuntamente con el resultado de si el gen deseado está o no presente al nivel predeterminado o más, como se ha mencionado anteriormente. Específicamente, como se representa en la figura 5, cuando el resultado de medición del espécimen de muestra (CK19) no es inferior a $2,5 \times 10^2$ (copias/ μ l), se presenta "+" que indica positivo. Cuando el resultado de medición de un espécimen de muestra es inferior a $2,5 \times 10^2$ (copias/ μ l) y el resultado de medición de la muestra de dilución (CK19-D) del espécimen de muestra es inferior a $2,5 \times 10^2$ (copias/ μ l), se presenta "-" que indica negativo. Cuando el resultado de medición del espécimen de muestra (CK19) es inferior a $2,5 \times 10^2$ (copias/ μ l) y el resultado de medición de la muestra de dilución (CK19-D) del espécimen de muestra no es inferior a $2,5 \times 10^2$ (copias/ μ l), se presenta "+" que indica positivo. La pantalla de navegador de datos representada en la figura 4 representa un ejemplo de un caso donde el resultado de medición del espécimen de muestra (CK19) es inferior a $2,5 \times 10^2$ (copias/ μ l) y el resultado de medición de la muestra de dilución (CK19-D) del espécimen de muestra no es inferior a $2,5 \times 10^2$ (copias/ μ l). Éste es el caso donde, como se representa en la figura 6, aunque el resultado de medición tomado usando una muestra de dilución (dilución de un espécimen de muestra) sea positivo, el resultado de medición tomado usando el espécimen de

muestra es negativo. Mientras tanto, “I” en “(+) I” que se muestra cuando el resultado de medición de un espécimen de muestra es inferior a $2,5 \times 10^2$ (copias)/ μl y el resultado de medición de una muestra de dilución del espécimen de muestra no es inferior a $2,5 \times 10^2$ (copias)/ μl , es un gráfico que indica que se produjo inhibición de amplificación.

5 En la pantalla de lista de carga de trabajo, como se representa en la figura 7, se presenta una barra de herramientas 121, en la que se presentan botones para ejecutar varias funciones tales como la función de imprimir, una unidad de introducción de orden 122 para introducir el orden de medición (indicación de medición), una unidad de presentación de lista de orden 123 para presentar el estado de registro de orden de medición, una columna de presentación de número de lote 124, una columna de selección de grupo 125, unidades de presentación de posición de colocación de célula 126a a 126e, una unidad de presentación de posición de colocación de muestra 127, y un botón de inicio de medición 128.

15 Además, la unidad de introducción de orden 122 se facilita para ejecutar la entrada de orden de medición para las posiciones de colocación de muestra 1 a 4, y la entrada de orden de medición para muestra de control de precisión (control positivo, control negativo) a poner en los agujeros de colocación de recipiente de muestra 21 y 21b (véase la figura 3). En esta unidad de introducción de orden 122 se ha dispuesto una columna de entrada de ID de muestra 122a, una columna de entrada de comentario 122b y un botón Enter 122c. Específicamente, usando el teclado 102a, la ID de muestra se introduce en la columna de entrada de ID de muestra 122a para el espécimen de muestra en las posiciones de colocación de muestra 1 a 4, y la muestra de control de precisión de los agujeros de colocación de recipiente de muestra 21a y 21b. Como con respecto a la ID de muestra, se introduce la ID correspondiente a control negativo o control positivo así como la ID correspondiente al espécimen de muestra. Con respecto a la ID de una muestra, por ejemplo, se usa “Muestra 01 - Muestra 04”. Con respecto a la ID de muestra de control positivo, se usa, por ejemplo, “QC [CK19-PC]”. Con respecto a la ID de muestra de control negativo, se usa, por ejemplo, “QC [CK19-NC]”. Cuando hay un comentario o comentarios, es posible introducir el comentario en la columna de entrada de comentario 122b de la unidad de introducción de orden 122. Cuando se pulsa el botón Enter 122c con el ratón 102b, la ID de muestra y el comentario o comentarios introducidos se reflejan en la unidad de presentación de lista de orden 123.

30 La columna de presentación de número de lote 124 presenta qué procesado de número de lote está teniendo lugar de forma similar a la columna de presentación de número de lote 1122 de la unidad de presentación de información de muestra 112 de la pantalla de navegador de datos (véase la figura 4). En la columna de selección de grupo 125, se selecciona un grupo de un menú desplegable 125a. Con respecto a este grupo, por ejemplo, se menciona un grupo para medir el espécimen de muestra, un grupo para medir el calibrador para obtener una curva analítica, o análogos. La presente realización muestra un ejemplo del caso donde se selecciona el grupo para medir un espécimen de muestra (muestra). Cuando se selecciona este grupo (muestra), se presenta “O” en una posición correspondiente a CK19 en la unidad de presentación de lista de orden 123.

40 Además, las unidades de presentación de posición de colocación de célula 126a a 126e se facilitan para presentar el estado puesto de la célula de detección 54 de cada uno de los bloques de detección de reacción 50a de la unidad de detección de reacción 50. Con respecto al estado puesto de la célula de detección 54, cuando se programa el uso y la célula de detección 54 se pone en el agujero de colocación de célula de detección 51a, se presenta “G” (en verde) en las unidades de presentación de posición de colocación de célula 126a y 126b, como se representa en la figura 7. Cuando la célula de detección 54 no está puesta en el agujero de colocación de célula de detección 51a aunque se programe el uso, se presenta “NG” (aparece en rojo) en una posición predeterminada de las unidades de presentación de posición de colocación de célula 126a a 126e. Cuando no hay que poner la célula de detección 54 en el agujero de colocación de célula de detección 51a dado que el uso no está programado, se presenta una configuración (aparece en gris) que muestra la unidad de reacción 51 en un estado en el que no hay necesidad de poner la célula de detección 54 en una posición predeterminada de las unidades de presentación de posición de colocación de célula 126a a 126e.

50 Además, la unidad de presentación de posición de colocación de muestra 127 se facilita para presentar el estado puesto del recipiente de muestra 22 para alojar un espécimen de muestra de la unidad de colocación de espécimen de muestra 20 del aparato de medición y amplificación de genes 101, el recipiente de muestra 23 para alojar muestra de dilución, el recipiente 24 para alojar control positivo, el recipiente 25 para alojar control negativo, el recipiente de reactivo de enzima 26, y el recipiente de reactivo iniciador 27. La unidad de presentación de posición de colocación de muestra 127 tiene unidades de presentación de recipiente de muestra 127a a 127j correspondientes a diez agujeros de colocación de recipiente de muestra 21a a 21j, una unidad de presentación de recipiente de reactivo de enzima 127k correspondiente al agujero de colocación de recipiente de reactivo de enzima 21k, y una unidad de presentación de recipiente de reactivo iniciador 127l correspondiente al agujero de colocación de recipiente de reactivo iniciador 21l. Símbolos (“PC” en la pantalla) correspondientes a la ID de muestra (QC “CK19-PC”) presentada en la unidad de presentación de lista de orden 123 se presentan en la unidad de presentación de recipiente de muestra 127a. Además, símbolos (“NC” en la pantalla) correspondiente a la ID de muestra (QC “CK19-NC”) presentados en la unidad de presentación de lista de orden 123 se presentan en la unidad de presentación de recipiente de muestra 127b.

65 Además, un símbolo (“S” que indica muestra en la pantalla) correspondiente a la ID de muestra presentada en la

- unidad de presentación de lista de orden 123 se presenta en las unidades de presentación de recipiente de muestra 127c, 127e, 127g y 127i. Un símbolo (“D” que indica dilución en la pantalla) que representa una muestra de dilución se presenta en las unidades de presentación de recipiente de muestra 127d, 127f, 127h y 127j. En la unidad de presentación de recipiente de reactivo de enzima 127k se presenta un símbolo (“E” en la pantalla) que indica que el recipiente de reactivo de enzima 26 se está poniendo, y en la unidad de presentación de recipiente de reactivo iniciador 127l se presenta un símbolo (“P” en la pantalla) que indica que el recipiente de reactivo iniciador 27 se ha colocado. En la presente realización se muestra una pantalla que indica que se ha completado la entrada de orden de medición para la posición de colocación de muestra 1.
- 5
- 10 La pantalla de presentación de curva analítica, como se representa en la figura 8, es una pantalla para presentar una curva analítica preparada por el calibrador de medición de tres concentraciones conocidas ($2,5 \times 10^3$ (copias/ μ l), $2,5 \times 10^5$ (copias/ μ l), $2,5 \times 10^7$ (copias/ μ l)), y tres puntos de concentración representados contra el tiempo de amplificación ascendente de calibrador se indican con una línea recta aproximada por una expresión lineal.
- 15 A continuación, las operaciones del sistema de análisis de amplificación de gen 1 según la presente realización se explicarán con referencia a las figuras 1 a 4, las figuras 7 y 8. Con el sistema de análisis de amplificación de gen 1 según la presente realización, como se ha mencionado anteriormente, un gen deseado (mRNA) derivado de un cáncer que está presente en un tejido reseccionado en operación de cáncer es amplificado usando el método LAMP, se mide la turbidez blanca debida a pirofosfato de magnesio generado por amplificación para determinar si el gen deseado existe o no al nivel predeterminado o más. Mientras tanto, con el método LAMP usado en la presente realización, aunque se realice un tratamiento para extraer el gen deseado (mRNA) tratando el tejido reseccionado, no se lleva a cabo tratamiento de purificación.
- 20
- 25 En primer lugar, como se representa en la figura 2 y la figura 3, los recipientes de muestra 22, en los que se aloja un líquido de extracción por solubilización (espécimen de muestra) producido con anterioridad por tratamiento (homogenización, filtración o análogos) del tejido reseccionado, se ponen en los agujeros de colocación de recipiente de muestra 21c, 21e, 21g y 21i. Los recipientes de muestra 23 que alojan las muestras de dilución en los que el espécimen de muestra a alojar en el recipiente de muestra 22 se diluye a diez veces, se ponen en los agujeros de colocación de recipiente de muestra 21d, 21f, 21h y 21j. El recipiente 24 en el que se aloja el control positivo y el recipiente 25 en el que se aloja el control negativo se ponen en el agujero de colocación de recipiente de muestra 21a y 21b, respectivamente (véase la figura 3). El recipiente de reactivo de enzima 26 en el que se aloja reactivo de enzima de CK19, y el recipiente de reactivo iniciador 27 en el que se aloja reactivo iniciador de CK19 se ponen en el agujero de colocación de recipiente de reactivo de enzima 21k (véase la figura 3) y el agujero de colocación de recipiente de reactivo iniciador 21l, respectivamente. Además, dos racks 32, cada uno de los cuales aloja 36 piezas de chips de pipeta desechables 31, están montados en la unidad de colocación de chips 30.
- 30
- 35 Antes de comenzar las mediciones, en la pantalla de la unidad de visualización 102c del ordenador personal 102 (pantalla de lista de carga de trabajo (véase la figura 7)) se dan instrucciones de medición, tal como el registro de ID de muestra, usando el teclado 102a y el ratón 102b del ordenador personal 102 representado en la figura 1.
- 40
- El usuario pulsa entonces, usando el ratón 102b (véase la figura 1), el botón de inicio de medición 128 en la pantalla de lista de carga de trabajo representada en la figura 7. Con esta manipulación, se inician las operaciones de medición del aparato de medición y amplificación de genes 101.
- 45
- 50 Cuando se inician las operaciones del aparato de medición y amplificación de genes 101, en primer lugar, la porción de brazo 11 del mecanismo dispensador 10 es desplazada desde una posición inicial a la unidad de colocación de chips 30 por la unidad de transferencia 60 representada en la figura 2, y a continuación, en la unidad de colocación de chips 30, dos unidades de jeringa 12 del mecanismo dispensador 10 son movidas hacia abajo. Mediante estas operaciones, un borde delantero de la parte de boquilla de cada una de dos unidades de jeringa 12 se encaja a presión en una abertura superior de cada uno de los dos chips de pipeta 31 y por lo tanto, el chip de pipeta 31 se monta automáticamente en el borde delantero de la parte de boquilla de cada una de dos unidades de jeringa 12. Después de que dos unidades de jeringa 12 son movidas hacia arriba, la porción de brazo 11 del mecanismo dispensador 10 es movida en la dirección del eje X hacia la parte superior del recipiente de reactivo iniciador 27 en el que se aloja reactivo iniciador de CK19. Después de que una unidad de jeringa 12 situada en la parte superior del recipiente de reactivo iniciador 27 se ha movido hacia abajo y se ha aspirado reactivo iniciador, otra unidad de jeringa 12 es movida posteriormente hacia arriba. Después de eso, la porción de brazo 11 del mecanismo dispensador 10 es movida en la dirección del eje Y por la unidad de transferencia 60 de modo que se pueda colocar otra unidad de jeringa 12 en la parte superior del mismo recipiente de reactivo iniciador 27. Después de que otra unidad de jeringa 12 sea movida hacia abajo y se aspire reactivo iniciador del mismo recipiente de reactivo iniciador 27, la otra unidad de jeringa 12 es movida hacia arriba. De esta forma, reactivo iniciador de CK19 presente en el recipiente de reactivo iniciador 27 es aspirado por dos chips de pipeta 31 montados en la unidad de jeringa 12.
- 55
- 60
- 65 Después de que el reactivo iniciador sea aspirado y después de que dos unidades de jeringa 12 sean movidas hacia arriba, la porción de brazo 11 del mecanismo dispensador 10 es movida por la unidad de transferencia 60 por encima del bloque de detección de reacción 50a que está colocado en la posición de colocación de célula 1 que es la más profunda (detrás de la parte delantera del aparato). Cuando dos unidades de jeringa 12 son movidas hacia

abajo en el bloque de detección de reacción 50a que está situado más profundo, se insertan dos chips de pipeta 31 montados en dos unidades de jeringa 12 en dos unidades de célula 54a de la célula de detección 54, respectivamente. A continuación, usando la unidad de jeringa 12, el reactivo iniciador de CK19 es descargado a dos unidades de célula 54a, respectivamente.

5 Después de descargar reactivo iniciador y de mover posteriormente dos unidades de jeringa 12 hacia arriba, la porción de brazo 11 del mecanismo dispensador 10 es movida por la unidad de transferencia 60 en la dirección del eje X hacia la parte superior de la unidad de desecho de chips 40. Entonces, el desecho del chip de pipeta 31 se lleva a cabo en la unidad de desecho de chips 40. Específicamente, después de que dos unidades de jeringa 12 son movidas hacia abajo, el chip de pipeta 31 se inserta en dos agujeros de desecho de chips 40a (véase la figura 3) de la unidad de desecho de chips 40. En este estado, cuando la porción de brazo 11 del mecanismo dispensador 10 es movida en la dirección del eje Y por la unidad de transferencia 60, el chip de pipeta 31 es movido debajo de la porción de ranura 40b. Cuando dos unidades de jeringa 12 son movidas hacia arriba, la porción de pestaña en el plano superior del chip de pipeta 31 contacta el plano inferior en ambos lados de la porción de ranura 40b, recibiendo por ello una fuerza hacia abajo del plano inferior, y por lo tanto, el chip de pipeta 31 se desengancha automáticamente de la parte de boquilla de cada una de dos unidades de jeringa 12. Mediante estas operaciones, el chip de pipeta 31 es desechado a la unidad de desecho de chips 40.

20 A continuación, la porción de brazo 11 del mecanismo dispensador 10 es movida de nuevo por la unidad de transferencia 60 a la unidad de colocación de chips 30. Después de esto, en la unidad de colocación de chips 30, se montan automáticamente dos nuevos chips de pipeta 31 en el borde delantero de la parte de boquilla de cada una de dos unidades de jeringa 12 por las mismas operaciones que se ha mencionado anteriormente. La porción de brazo 11 del mecanismo dispensador 10 es movida en la dirección del eje X hacia la parte superior del recipiente de reactivo de enzima 26 en el que se aloja reactivo de enzima de CK19. Después de que una unidad de jeringa 12 situada en la parte superior del recipiente de reactivo de enzima 26 sea movida hacia abajo y se aspire reactivo de enzima, una unidad de jeringa 12 es movida hacia arriba. Después de ello, la porción de brazo 11 del mecanismo dispensador 10 es movida en la dirección del eje Y por la unidad de transferencia 60 de modo que se pueda colocar otra unidad de jeringa 12 en la parte superior del mismo recipiente de reactivo de enzima 26. Después de que otra unidad de jeringa 12 sea movida hacia abajo y se aspire reactivo de enzima del mismo recipiente de reactivo de enzima 26, la otra unidad de jeringa 12 es movida hacia arriba. De esta forma, reactivos de enzima presentes en el recipiente de reactivo de enzima 26 son aspirados por dos chips de pipeta 31 montados en la unidad de jeringa 12.

35 Después de que la porción de brazo 11 del mecanismo dispensador 10 es movida a la parte superior del bloque de detección de reacción 50a situado más profundo por la unidad de transferencia 60, el reactivo de enzima de CK19 es descargado a dos unidades de célula 54a de la célula de detección 54. Después de descargar el reactivo de enzima, y después de que la porción de brazo 11 del mecanismo dispensador 10 es movida por encima de la unidad de desecho de chips 40 por la unidad de transferencia 60, se lleva a cabo desecho del chip de pipeta 31.

40 A continuación, la porción de brazo 11 del mecanismo dispensador 10 es movida de nuevo por la unidad de transferencia 60 a la unidad de colocación de chips 30, se monta automáticamente dos nuevos chips de pipeta 31 en el borde delantero de la parte de boquilla de cada una de dos unidades de jeringa 12. La porción de brazo 11 del mecanismo dispensador 10 es movida en la dirección del eje X hacia la parte superior del recipiente de muestra 22 y el recipiente de muestra 23 en los que se alojan el espécimen de muestra y la muestra de dilución colocados en la unidad de colocación de espécimen de muestra 20, y después de ello, el espécimen de muestra y la muestra de dilución en los recipientes de muestra 22 y 23 son aspirados de una vez por las mismas operaciones de aspiración de reactivo iniciador y reactivo de enzima que las mencionadas anteriormente. Después de ello, la porción de brazo 11 del mecanismo dispensador 10 es movida por encima del bloque de detección de reacción 50a situado más profundo por la unidad de transferencia 60, y a continuación dos unidades de jeringa 12 son movidas hacia abajo, y el espécimen de muestra y la muestra de dilución son descargados a dos unidades de célula 54a de la célula de detección 54, respectivamente. Mientras tanto, al dispensar reactivo iniciador, reactivo de enzima y espécimen de muestra (muestra de dilución), la temperatura del líquido en la célula de detección 54 se mantiene a aproximadamente 20°C. A continuación, la porción de brazo 11 del mecanismo dispensador 10 es movida por encima de la unidad de desecho de chips 40 por la unidad de transferencia 60, y luego se lleva a cabo el desecho del chip de pipeta 31.

55 Después de descargar reactivo iniciador, reactivo de enzima, espécimen de muestra y la muestra de dilución a dicha unidad de célula 54a, se lleva a cabo la operación de cierre de la unidad de cubierta 54b de la célula de detección 54. Después de terminar la operación de cierre, la temperatura de líquido en la célula de detección 54 se eleva de aproximadamente 20°C a aproximadamente 65°C para permitir la amplificación de gen deseado (mRNA) por reacción LAMP (amplificación DE gen). A continuación, la turbidez blanca debida a pirofosfato de magnesio generado por amplificación es detectada por turbidimetría. Específicamente, la detección de turbidez se lleva a cabo detectando (supervisando) la turbidez en la célula de detección 54 en reacción de amplificación usando una fuente de luz LED 52a y una unidad de recepción de luz de fotiodiodo 52b representada en la figura 3.

65 Los datos de turbidez (primeros resultados de medición) del espécimen de muestra y los datos de turbidez (segundos resultados de medición) de la muestra de dilución son transmitidos desde el aparato de medición y

amplificación de genes 101 al ordenador personal 102 en tiempo real. En base a los primeros resultados de medición y los segundos resultados de medición recibidos, la CPU 102d del ordenador personal 102 determina si se produce o no inhibición de amplificación de gen.

5 Ahora, el flujo de determinación de inhibición de amplificación de la CPU 102d del ordenador personal 102 se explicará con referencia a la figura 10. En primer lugar, en el paso S1, la CPU 102d recibe del aparato de medición y amplificación de genes 101 datos de turbidez de espécimen de muestra y la muestra de dilución, respectivamente, y los adquiere. Posteriormente, en el paso 2, en base a los datos de turbidez del espécimen de muestra y la muestra de dilución, la CPU 102d presenta un gráfico 113a, como el representado en la figura 4, que muestra la relación
10 entre tiempo de reacción (min) y turbidez en la pantalla de navegador de datos de la unidad de visualización 102c. El gráfico 113a representado en la figura 4 es un gráfico que muestra la relación entre tiempo de reacción (min) del espécimen de muestra y la turbidez. Los pasos S1 a S2, en los que los datos de turbidez son adquiridos y se presenta el gráfico 113a, se realizan en tiempo real y están diseñados de modo que la presentación del gráfico 113a se renueve siempre que se reciban datos de turbidez. Cuando el tiempo de reacción llega a 16 min, se completa la
15 adquisición de datos y la presentación del gráfico 113a.

A continuación, en el paso S3, la CPU 102d visualiza tiempo de subida "10,7 (min)" del espécimen de muestra correspondiente a turbidez 0,1 en el gráfico 113a en la columna de presentación de tiempo de subida de amplificación 113b. En el paso S4, la CPU 102d calcula las concentraciones de ácido nucleico del espécimen de muestra y la muestra de dilución a partir del tiempo de subida de cada uno del espécimen de muestra y la muestra de dilución y a partir de la curva analítica representada en la figura 8. En el paso S5, la CPU 102d visualiza la concentración de ácido nucleico o el rango de concentración de ácido nucleico del espécimen de muestra (" $<2,5E + 02$ " en la pantalla) en la columna de presentación de medición de concentración 113c. A continuación, en el paso S6, la CPU 102d determina la presencia o ausencia de inhibición de amplificación en base a la concentración de
20 ácido nucleico de cada uno del espécimen de muestra y la muestra de dilución. Específicamente, se determina que se produce inhibición de amplificación cuando la concentración de ácido nucleico de un espécimen de muestra es inferior a $2,5 \times 10^2$ (copias/ μ l) y la concentración de ácido nucleico de la muestra de dilución no es inferior a $2,5 \times 10^2$ (copias/ μ l). En los casos distintos de éste se determina que no se produce inhibición de amplificación. Entonces, en el paso S7, la CPU 102d presenta el señalizador "1" que indica aparición de inhibición de amplificación en la
25 columna de presentación de resultado de determinación 113d. Mientras tanto, aunque la concentración de ácido nucleico en la muestra se calcula a partir del tiempo de subida de la muestra correspondiente a turbidez 0,1 y la curva analítica representada en la figura 8 después de que el tiempo de reacción llega a 16 min, la concentración de ácido nucleico en la muestra puede ser calculada a partir del tiempo de subida de la muestra correspondiente a turbidez 0,1 y la curva analítica representada en la figura 8 en el punto en que la turbidez llega a 0,1 antes de que el
30 tiempo de reacción llegue a 16 min. Si éste es el caso, el paso S1 al paso S2 y el paso S3 al paso S7 se someten a procesado en paralelo.

Como se ha mencionado anteriormente, la detección de un gen deseado (mRNA) se lleva a cabo en el bloque de detección de reacción 50a situado más profundo y, al mismo tiempo, el resultado de la detección se presenta en la
35 unidad de visualización 102c. Además, con respecto a los bloques de detección de reacción 50a en segundo a cuarto lugar desde atrás, las mismas operaciones de detección de gen deseado observadas en el bloque de detección de reacción 50a en la posición de colocación de célula 1 se llevan a cabo secuencialmente. Y, en el bloque de detección de reacción 50a situado en la posición de colocación de célula 5 situada en quinto lugar desde atrás, de forma similar a la operación de detección de gen deseado en el bloque de detección de reacción 50a en la
40 posición de colocación de célula 1 mencionada anteriormente, se mide el control positivo en el recipiente 24 colocado en el agujero de colocación de recipiente de muestra 21a de la unidad de colocación de espécimen de muestra 20 y el control negativo en el recipiente 25 colocado en el agujero de colocación de recipiente de muestra 21b, y se determina si los resultados de la detección en el bloque de detección de reacción 50a en las posiciones de colocación de célula 1 a 4 son o no correctos. Mediante estas operaciones, se completa un procesado de lote en el
45 que se procesan colectivamente cuatro especímenes de muestra (incluyendo cuatro muestras de dilución). De esta forma, las operaciones del sistema de amplificación y análisis de genes 1 se completan ejecutando procesado de lote tantas veces como las predeterminadas.

Según la presente realización, como se ha mencionado anteriormente, en algunos casos es posible confirmar que la
50 amplificación de un gen deseado (mRNA), que se consideró negativa por el resultado de medición por el espécimen de muestra, es positiva a partir del resultado de medición de una muestra de dilución, como muestra el gráfico en la figura 6, adquiriendo el resultado de medición (concentración) obtenido por una muestra de dilución de iniciador y enzima de amplificación de ácido nucleico y espécimen de muestra, además del resultado de medición (concentración) obtenido por el iniciador y enzima de amplificación de ácido nucleico y espécimen de muestra. Esto
55 es atribuible a que sustancias de inhibición, que se adhieren a un gen deseado y el enzima de amplificación de ácido nucleico al tiempo de la medición por espécimen de muestra e inhiben la amplificación del gen deseado, son liberadas en la muestra de dilución al tiempo de la medición de la muestra de dilución. En este caso, es posible determinar que la inhibición de amplificación del gen deseado se produjo al tiempo de la medición del espécimen de muestra a partir del resultado de medición por el espécimen de muestra con el que la amplificación del gen deseado
60 no se confirmó y del resultado de medición por la muestra de dilución con que la amplificación del gen deseado se confirmó. Como resultado, es posible adquirir un resultado de medición exacto en el que la presencia o ausencia de

aparición de inhibición de amplificación se toma en cuenta, a partir del resultado de medición por el espécimen de muestra y el resultado de medición por la muestra de dilución.

5 Además, en la presente realización, facilitando la unidad de visualización 102c para presentar información relativa a la inhibición de amplificación de gen deseado (mRNA), es posible que el usuario confirme información relativa a inhibición de amplificación (señalizador "I") adquirida en base al resultado de medición (concentración) por espécimen de muestra y resultado de medición (concentración) por muestra de dilución.

10 Además, en la presente realización, haciendo que la CPU 102d del ordenador personal 102 determine si un gen deseado (mRNA) está o no presente al nivel predeterminado o más (positivo "+", negativo "-") en base al resultado de medición por la muestra de dilución y que envíe el resultado de la determinación (señalizador "I") de inhibición de amplificación de presencia del gen deseado no menor que el nivel predeterminado por la CPU 102d, juntamente con el resultado de la determinación de inhibición de amplificación (señalizador "I"), a la unidad de visualización 102c, es posible determinar si un gen deseado está o no presente al nivel predeterminado o más con el resultado de medición usando la muestra de dilución, sin quedar afectado por la inhibición de amplificación, incluso un caso donde la inhibición de amplificación se produce al tiempo de medición de espécimen de muestra, y por lo tanto, es posible determinar exactamente si un gen deseado está o no presente al nivel predeterminado o más. Además, los usuarios pueden confirmar no solamente la presencia o ausencia de inhibición de amplificación, sino también si un gen deseado está o no presente al nivel predeterminado o más enviando el resultado de la determinación de si un gen deseado está o no presente al nivel predeterminado o más, conjuntamente con el resultado de la determinación de inhibición de amplificación a la unidad de visualización 102c.

25 Además, en la presente realización, es posible confirmar la amplificación de un gen deseado (mRNA), que no se podría confirmar por el resultado de medición por espécimen de muestra, a partir del resultado de medición por muestra de dilución, usando muestras no purificadas como el espécimen de muestra y la muestra de dilución, y adquiriendo el resultado de medición medido usando la muestra de dilución además del resultado de medición por el espécimen de muestra, aunque se contenga una gran cantidad de sustancias inhibitoras en el espécimen de muestra y la muestra de dilución. Como resultado, es posible adquirir rápidamente un resultado de medición exacto aunque se usen el espécimen de muestra sin purificar y la muestra de dilución, que no requieren tiempo para purificar el gen deseado (mRNA) a partir del espécimen de muestra y la muestra de dilución.

30 Se deberá entender que las realizaciones aquí descritas son ejemplificaciones en todos los aspectos y no constituyen ningún límite. El alcance de la presente invención se define por las reivindicaciones anexas, pero no por las descripciones de las realizaciones descritas anteriormente, y se considera que todas las modificaciones dentro de las reivindicaciones anexas y equivalentes quedan incluidas dentro del alcance de la presente invención.

35 Por ejemplo, en dicha realización, aunque se describe un caso donde la presente invención se aplica a un sistema de amplificación y análisis de genes incluyendo un aparato de medición y amplificación de genes y un ordenador personal, la presente invención no se limita a ello, y el aparato de medición y amplificación de genes puede ser usado solo o el aparato de medición y amplificación de genes puede estar configurado para habilitar funciones del ordenador personal.

40 Además, en dicha realización, aunque se ejemplifica el caso donde el señalizador "I" que indica aparición de inhibición de amplificación se presenta cuando el resultado de medición (concentración) de espécimen de muestra (CK19) es inferior a $2,5 \times 10^2$ (copias/41) y, al mismo tiempo, el resultado de medición (concentración) de muestra de dilución del espécimen de muestra (CK19-D) no es inferior a $2,5 \times 10^2$ (copias/ μ l), la presente invención no se limita a ello, y el señalizador que indica aparición de inhibición de amplificación puede ser presentado cuando el resultado de medición de la muestra de dilución sea mayor que el resultado de medición del espécimen de muestra comparando el resultado de medición (concentración) del espécimen de muestra con el resultado de medición (concentración) de la muestra de dilución del espécimen de muestra.

45 Además, en dicha realización, aunque se describe un ejemplo donde un recipiente de muestra que aloja el espécimen de muestra y su muestra de dilución se coloca en el agujero de colocación de recipiente de muestra de la unidad de colocación de espécimen de muestra, la presente invención no se limita a ello, y se puede hacer una alternativa donde, como el aparato de medición y amplificación de genes 201 según la variante de la presente realización representada en la figura 9, la unidad dilución 221 para montar un recipiente que aloje líquido de dilución se facilita en la unidad de colocación de espécimen de muestra 220, el líquido de dilución se dispensa desde la unidad de dilución 221 pasándolo a una unidad de célula 54b de la célula de detección por el mecanismo dispensador 10, y la muestra de dilución se produzca automáticamente en el aparato de medición y amplificación de genes 201. En este caso, es preferible que, cuando el resultado de medición de un espécimen de muestra no es inferior a $2,5 \times 10^2$ (copias/ μ l), no se produzca una muestra de dilución; y cuando el resultado de medición del espécimen de muestra es inferior a $2,5 \times 10^2$ (copias/ μ l), se produce la muestra de dilución. Con esta consideración, cuando el resultado de medición de un espécimen de muestra no es inferior a $2,5 \times 10^2$ (copias/ μ l), es evidente que el resultado de la determinación es positivo "+" y por lo tanto, es posible suprimir el desperdicio de líquido de dilución requerido para la preparación de la muestra de dilución.

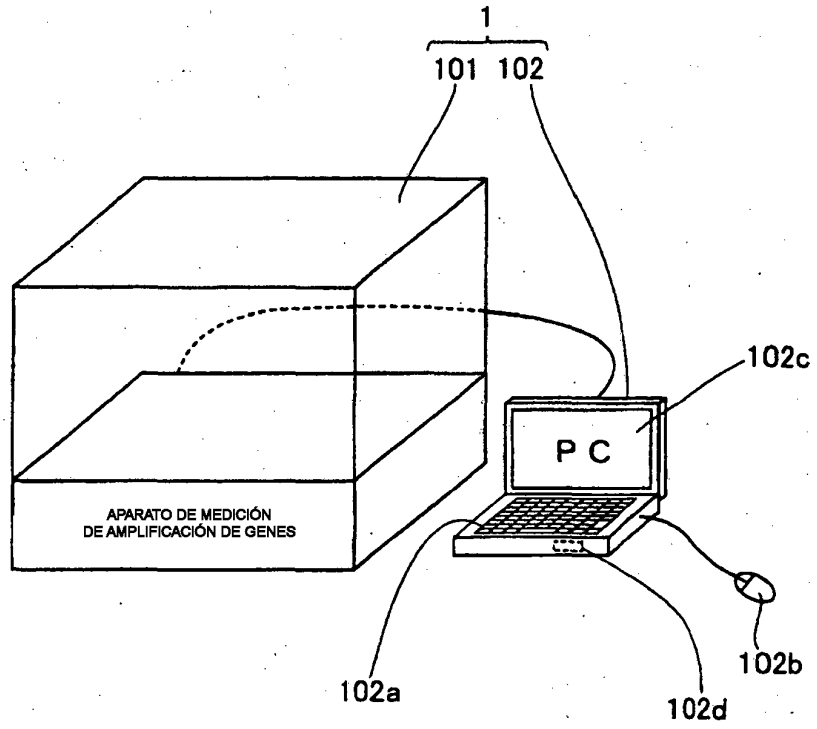
- Además, en dicha realización, aunque se determina que el producto de amplificación de ácido nucleico (concentración deseada de ácido nucleico) de la muestra de dilución del espécimen de muestra tiene inhibición de amplificación de concentración deseada de ácido nucleico, cuando el producto de amplificación de ácido nucleico (concentración deseada de ácido nucleico) del espécimen de muestra es abundante, se puede determinar que el producto de amplificación de ácido nucleico (concentración deseada de ácido nucleico) de la muestra de dilución del espécimen de muestra tiene inhibición de amplificación de concentración deseada de ácido nucleico cuando el producto de amplificación de ácido nucleico de muestra de dilución de espécimen de muestra es más abundante que el producto de amplificación de ácido nucleico proporcional a la tasa de dilución, incluso cuando el producto de amplificación de ácido nucleico (concentración deseada de ácido nucleico) del espécimen de muestra es insuficiente. Por ejemplo, cuando el producto de amplificación de ácido nucleico del espécimen de muestra es 25×10^2 (copias/ μ l), el producto de amplificación de ácido nucleico producto de muestra de dilución a diez veces, que deberá ser $2,5 \times 10^2$ (copias/ μ l), es 15×10^2 (copias/ μ l) y no es proporcional a la tasa de dilución, se puede determinar que hay inhibición de amplificación de concentración deseada de ácido nucleico.
- Además, en dicha realización, aunque se determine si el ácido nucleico deseado está o no presente a un nivel predeterminado o más midiendo el pirofosfato de magnesio (producto de amplificación de ácido nucleico) de la muestra. En este caso, es preferible determinar si el ácido nucleico deseado está o no presente a un nivel predeterminado o más midiendo el producto deseado de amplificación de ácido nucleico de la muestra.
- Además, en dicha realización, aunque el espécimen de muestra, el reactivo de enzima y el reactivo iniciador de CK19 se dispensen del recipiente de muestra 22, el recipiente de reactivo de enzima 26 y el recipiente de reactivo iniciador 27 a una unidad de célula 54a de la célula de detección por el mecanismo dispensador 10, y la muestra de dilución, el reactivo de enzima y el reactivo iniciador de CK19 se dispensen desde el recipiente de muestra 23, el recipiente de reactivo de enzima 26 y el recipiente de reactivo iniciador 27 a una unidad de célula 54b de la célula de detección por el mecanismo dispensador 10. En este caso, es preferible que se prepare una primera muestra a partir del espécimen de muestra, el reactivo de enzima y el reactivo iniciador de CK19 y una segunda muestra a partir de la muestra de dilución, el reactivo de enzima y el reactivo iniciador de CK19, y se dispense la primera muestra y la segunda muestra a la unidad de célula 54a y 54b de la célula de detección por el mecanismo dispensador 10, respectivamente.

REIVINDICACIONES

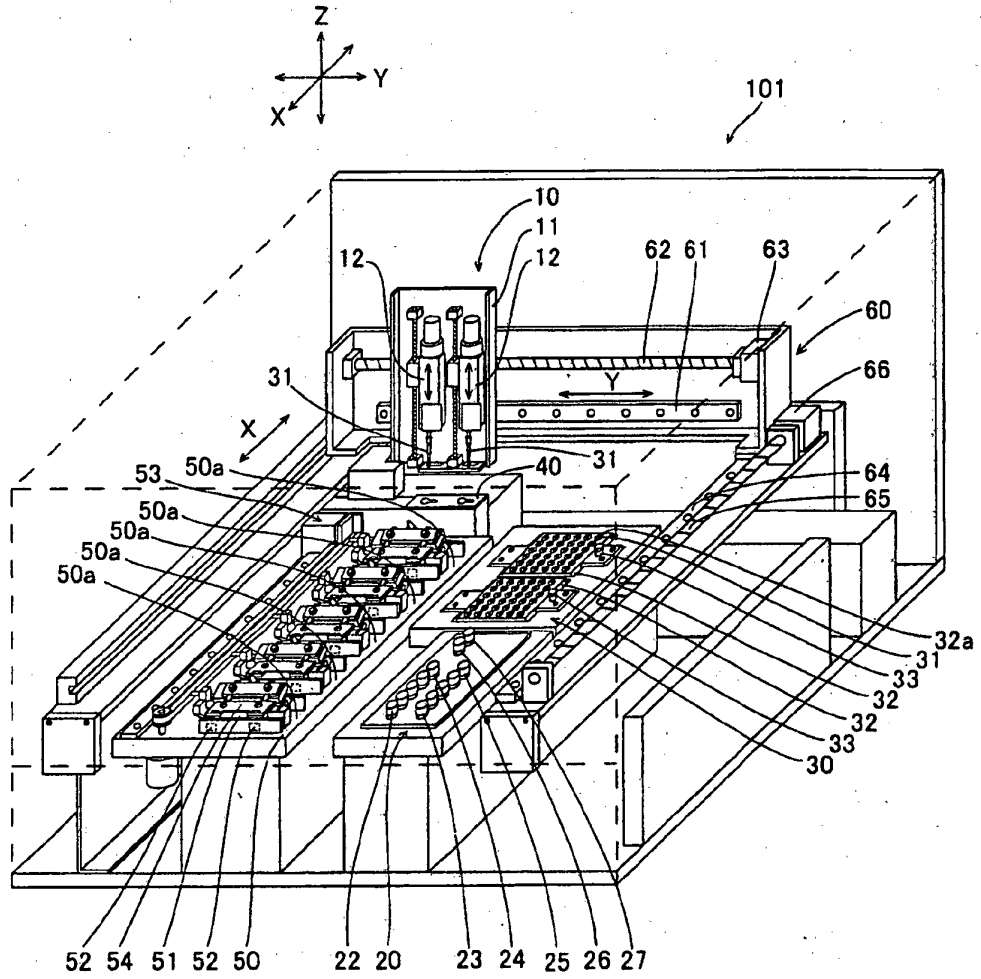
1. Aparato para amplificación y medición de un ácido nucleico deseado en muestras de medición derivadas de un organismo vivo, incluyendo:
- 5 una unidad (101) para amplificar el ácido nucleico deseado en una muestra de medición preparada a partir del organismo vivo, y medir un producto de la amplificación del ácido nucleico deseado;
- 10 una unidad (101) para obtener un valor de medición relacionado con una cantidad del producto de la amplificación;
- caracterizado** el aparato por
- 15 una unidad para determinar (102d) si la amplificación del ácido nucleico deseado es inhibida en base a un primer valor de medición obtenido de una primera muestra de medición, y un segundo valor de medición obtenido de una segunda muestra de medición que tiene una relación de dilución más alta en comparación con la primera muestra de medición, donde la unidad (102d) es para determinar que la amplificación es inhibida cuando una cantidad del segundo producto en base al segundo valor de medición es mayor que la del primer producto en base al primer valor de medición, o
- 20 para determinar que la amplificación del ácido nucleico deseado es inhibida cuando el primer valor de medición y el segundo valor de medición no son proporcionales a las relaciones de dilución de la primera muestra de medición y la segunda muestra de medición;
- 25 y donde dicho aparato incluye una unidad de análisis (102d) para determinar si el ácido nucleico deseado en la muestra de medición derivada de un organismo vivo se expresa excesivamente en base a una comparación entre un valor umbral y el primer valor de medición cuando la unidad de determinación (102d) determina que no hay inhibición de amplificación, o
- 30 para determinar si el ácido nucleico deseado en una muestra biológica se expresa excesivamente en base a una comparación entre un segundo valor umbral y el segundo valor de medición cuando la unidad de determinación (102d) determina que hay inhibición de amplificación.
2. El aparato según la reivindicación 1, incluyendo además una unidad de salida para enviar información relacionada con el resultado de la determinación por la unidad de determinación (102d).
- 35 3. El aparato según la reivindicación 1, incluyendo además una unidad de salida (102c) para enviar información relativa al resultado de la determinación por la unidad de análisis.
- 40 4. El aparato según la reivindicación 1, incluyendo además una unidad de salida (102c) para enviar positivo o negativo en base al resultado de la determinación relativo a la expresión de exceso.
5. El aparato según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, incluyendo además:
- 45 una parte de colocación de muestra para poner un primer recipiente y un segundo recipiente, alojando el primer recipiente la primera muestra de medición y alojando el segundo recipiente la segunda muestra de medición; y
- 50 una unidad dispensadora para dispensar la primera muestra de medición del primer recipiente a un primer recipiente de reacción en la unidad para amplificar y dispensar la segunda muestra de medición del segundo recipiente a un segundo recipiente de reacción en la unidad para amplificación.
6. El aparato según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, incluyendo además:
- 55 una parte de colocación de muestra para poner un primer recipiente y un segundo recipiente, donde el primer recipiente es para acomodar una muestra pretratada que se prepara a partir de un organismo vivo y un líquido de pretratamiento y contiene ácido nucleico solubilizado en el líquido de pretratamiento, y el segundo recipiente es para acomodar un líquido de dilución; y
- 60 una unidad dispensadora para dispensar la muestra pretratada del primer recipiente a un primer recipiente de reacción y un segundo recipiente de reacción en la unidad para medición y dispensar el líquido de dilución del segundo recipiente al segundo recipiente de reacción.
7. Un método para amplificación y medición de un ácido nucleico deseado en muestras de medición preparadas a partir de un organismo vivo, incluyendo los pasos de:
- 65 (a) amplificar el ácido nucleico deseado en una primera muestra de medición preparada a partir del organismo vivo;

- (b) amplificar el ácido nucleico deseado en una segunda muestra de medición preparada a partir del organismo vivo y que tiene una relación de dilución más alta en comparación a la primera muestra de medición;
- 5 (c) obtener un primer valor de medición relacionado con una cantidad del primer producto generado amplificando el ácido nucleico deseado en la primera muestra de medición;
- (d) obtener un segundo valor de medición relacionado con una cantidad del segundo producto generado amplificando el ácido nucleico deseado en la segunda muestra de medición; y
- 10 (e) determinar que la amplificación del ácido nucleico deseado es inhibida cuando el segundo valor de medición es mayor que el primer valor de medición;
- incluyendo además:
- 15 (f) determinar si el ácido nucleico deseado se expresa excesivamente en base a una comparación entre un valor umbral y el primer valor de medición cuando el resultado de la determinación (e) es no aparición de inhibición de amplificación; o
- 20 (g) determinar si el ácido nucleico deseado se expresa excesivamente en base a una comparación entre un segundo valor umbral y el segundo valor de medición cuando el resultado de la determinación (e) es aparición de inhibición de amplificación.
8. El método según la reivindicación 7, incluyendo además el paso de enviar información relativa al resultado de la determinación.
- 25 9. El método según la reivindicación 7, incluyendo además un paso de enviar positivo o negativo en base al resultado de la determinación relativo a la expresión de exceso.

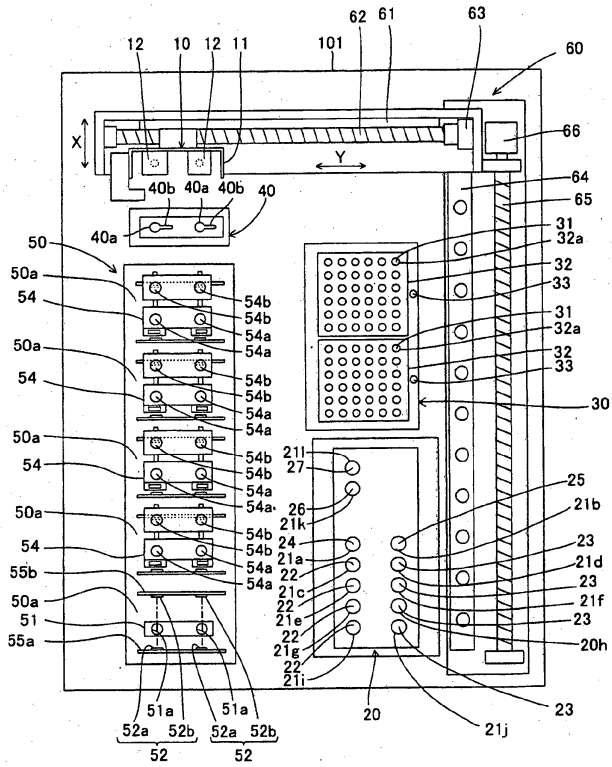
[Fig. 1]



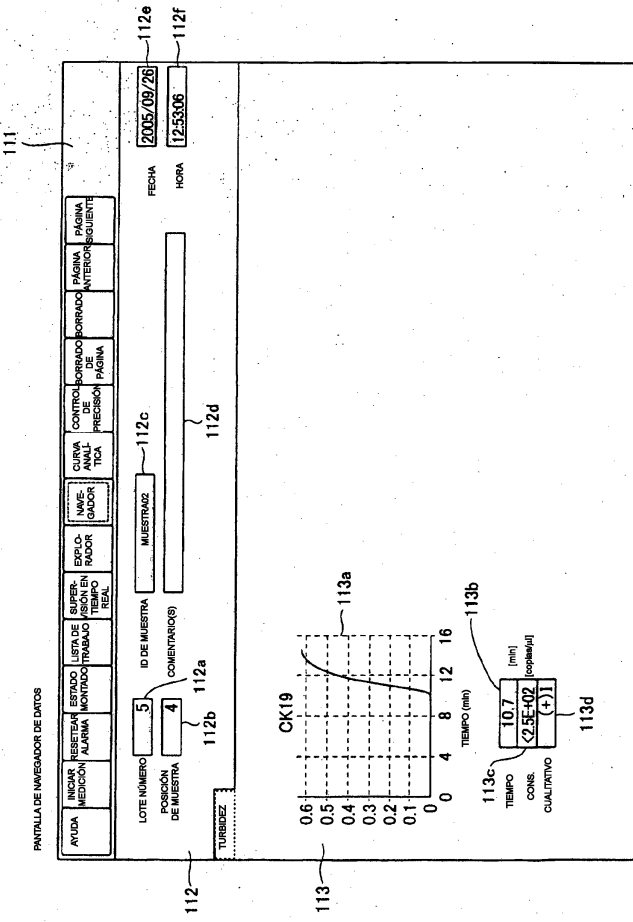
[Fig. 2]



[Fig. 3]



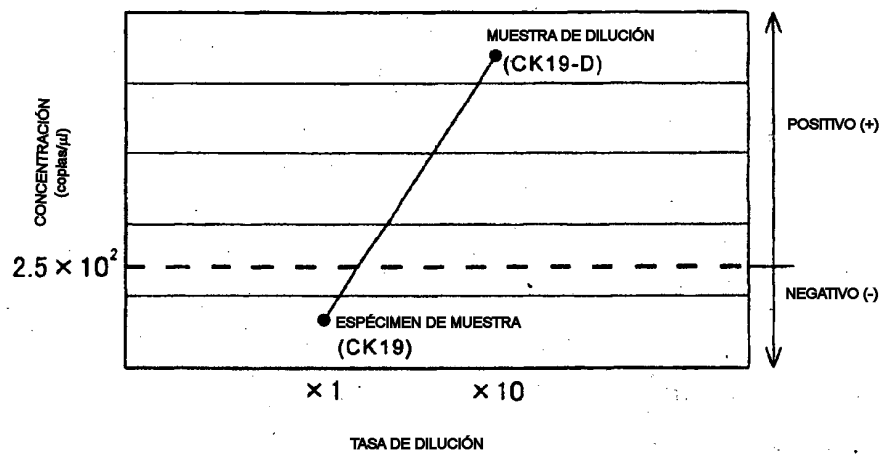
[Fig. 4]



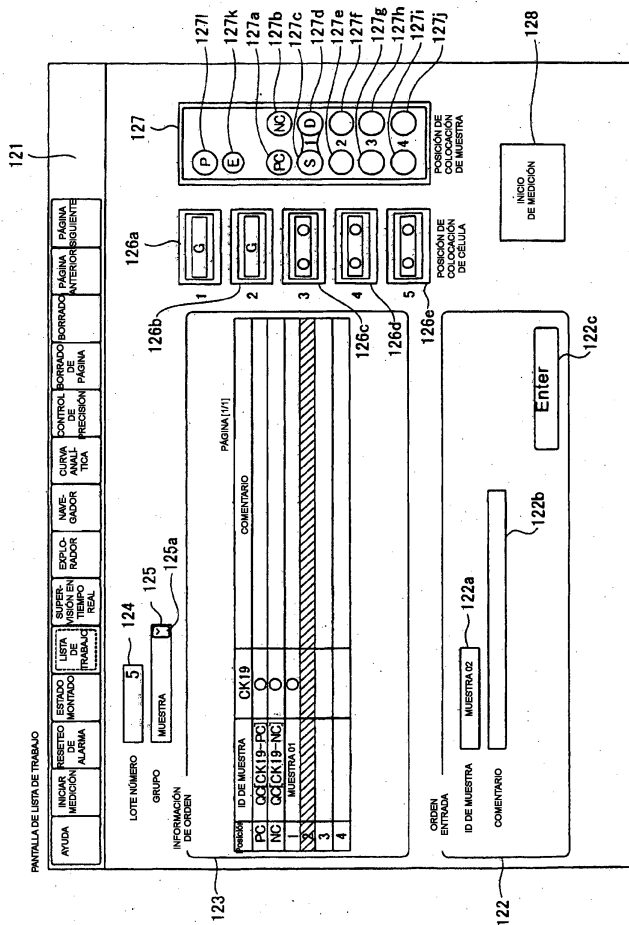
[Fig. 5]

MUESTRA DE DILUCIÓN (CK19-D)	copla < 250	$250 \leq$ copla
ESPÉCIMEN DE MUESTRA (CK19)	(+)	
$250 \leq$ copla	(+)	
copla < 250	(-)	(+)

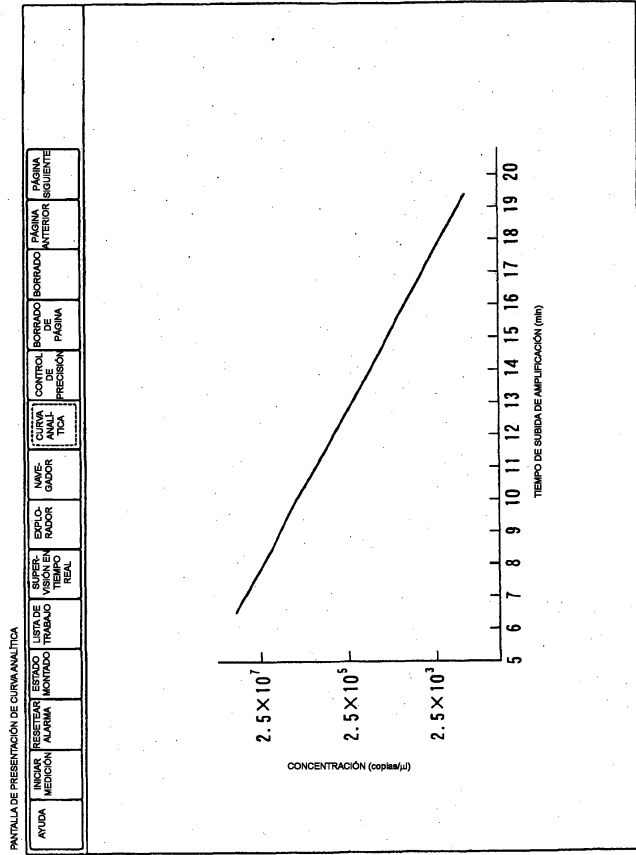
[Fig. 6]



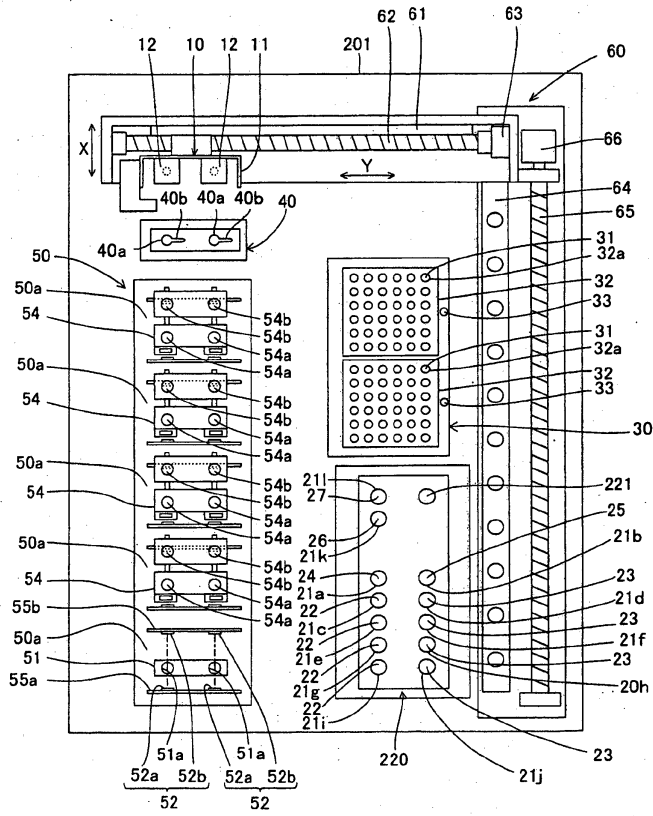
[Fig. 7]



[Fig. 8]



[Fig. 9]



[Fig. 10]

