

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 645 468**

51 Int. Cl.:

<b>C12M 1/00</b>	(2006.01)
<b>C12M 1/34</b>	(2006.01)
<b>G01N 33/53</b>	(2006.01)
<b>G01N 33/543</b>	(2006.01)
<b>G01N 33/566</b>	(2006.01)
<b>G01N 30/90</b>	(2006.01)
<b>G01N 33/52</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.07.2013 PCT/JP2013/068565**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **09.01.2014 WO14007385**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.07.2013 E 13813719 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.09.2017 EP 2871229**

54 Título: **Herramienta de inspección para cromatografía de ácidos nucleicos**

30 Prioridad:

**06.07.2012 JP 2012153114**

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

**05.12.2017**

73 Titular/es:

**NGK INSULATORS, LTD. (100.0%)  
2-56, Suda-cho Mizuho-ku  
Nagoya-shi, Aichi 467-8530, JP**

72 Inventor/es:

**OKUMURA, HIDEMASA y  
HIROTA, TOSHIKAZU**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 645 468 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

Herramienta de inspección para cromatografía de ácidos nucleicos

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a una herramienta de inspección para cromatografía de ácidos nucleicos que se puede utilizar para un diagnóstico relacionado con una infección, una alergia y similares, y para la detección de una bacteria, un virus y similares.

10

**Técnica anterior**

Es posible examinar la presencia o ausencia de un ácido nucleico (ADN o ARN) que se origina en un virus o una bacteria, y la presencia o ausencia de un ácido nucleico que se origina en el gen mutante relacionado con una enfermedad específica o diátesis de forma que se diagnostique de forma precisa una infección, un trastorno genético tal como un tumor, una diátesis o similar. Por ejemplo, para el diagnóstico de la presencia o ausencia de una infección vírica se obtiene una muestra de ensayo de una membrana mucosa del paciente y similar, para realizar un procedimiento para amplificar solo el ácido nucleico que se origina en el virus utilizando un método de PCR. Cuando el ácido nucleico que se origina en el virus se detecta en la muestra de ensayo obtenida en este procedimiento, se puede determinar que el paciente está infectado por el virus. Hoy en día el desarrollo del análisis genómico provoca la acumulación de información relacionada con la secuencia de bases del ácido nucleico, tal como un gen. De forma adicional, la mejora del método de PCR facilita la amplificación de forma selectiva del ácido nucleico que se origina en el virus o en la bacteria, o el ácido nucleico que se origina en el gen mutante específico. Por lo tanto, para una mayor popularización de la aplicación del método de diagnóstico descrito anteriormente para el ácido nucleico, existe una necesidad de una técnica para determinar de forma simple la presencia o ausencia de un ácido nucleico específico.

15

20

25

Como una técnica para determinar de forma simple la presencia o ausencia del ácido nucleico específico (en lo sucesivo en el presente documento denominado "el ácido nucleico diana"), se propone una herramienta de inspección para cromatografía de ácidos nucleicos (en los documentos de patente 1 y 2). Esta herramienta de inspección para cromatografía de ácidos nucleicos expande una muestra de ensayo líquida en una lámina porosa utilizando un sistema similar al de la cromatografía en papel, y captura el ácido nucleico diana contenido en la muestra de ensayo utilizando una sonda de ácido nucleico fijada a la superficie de la lámina porosa. Además, el ácido nucleico diana capturado se colorea para indicar la detección del ácido nucleico diana en la superficie de la lámina porosa. Por lo tanto, en la herramienta de inspección para cromatografía de ácidos nucleicos, en el caso en que el ácido nucleico diana está contenido en la muestra de ensayo, la indicación aparece en la superficie de la lámina porosa. Por otro lado, en el caso en que el ácido nucleico diana no está contenido en la muestra de ensayo, la indicación no aparece en la superficie de la lámina porosa. Con este sistema extremadamente simple es posible determinar la presencia o ausencia del ácido nucleico diana.

30

35

40

Normalmente, la herramienta de inspección para cromatografía de ácidos nucleicos se utiliza extensamente como una pieza de prueba (esta se denomina habitualmente como "la tira") hecha mediante la unión de la lámina porosa en una forma rectangular alargada a un panel (lámina de refuerzo) en una forma rectangular alargada (en los documentos de patente 3 y 4). Por ejemplo, en el caso en que el ácido nucleico diana está marcado previamente con un colorante, cuando se prepara la muestra de ensayo, la inserción de la porción del extremo distal de la tira anteriormente descrita en un tubo de ensayo que contiene la muestra de ensayo provoca capilaridad para expandir la muestra de ensayo en la lámina porosa, sin ninguna operación posterior. Después, el ácido nucleico diana se captura y acumula en la posición en donde la sonda de ácido nucleico está fijada en la lámina porosa. Esto permite colorear la superficie de lámina porosa (en la porción en donde la sonda de ácido nucleico está fijada). Por consiguiente, como una ventaja, pueden inspeccionarse de forma simultánea múltiples muestras de ensayo, incluso con un trabajo muy simple de solo insertar las tiras de la herramienta de inspección para cromatografía de ácidos nucleicos en respectivos múltiples tubos de ensayo.

45

50

Listado de citas

55

Documentos de patente

Documento de patente 1: JP-A-2001-157598

60

Documento de patente 2: JP-A-2005-503556

Documento de patente 3: JP-A-2006-201062

Documento de patente 4: JP-A-2010-14507

65

## Sumario de la invención

### Problema a resolver por la invención

5 Sin embargo, en la tira de la herramienta de inspección para cromatografía de ácidos nucleicos anteriormente descrita, en el caso en que la concentración del ácido nucleico diana en la muestra de ensayo sea baja, el color de la indicación, que indica la detección del ácido nucleico diana, se hace débil y borroso, y en algunos casos es difícil determinar la presencia del ácido nucleico diana (como un primer problema de la técnica convencional).

10 La tira de la herramienta de inspección para cromatografía de ácidos nucleicos anteriormente descrita es la pieza de prueba alargada y estrecha. Por consiguiente, en el caso en que la tira se observa desde una dirección distinta de la vista frontal, en particular, en el caso en que la tira se observa desde la vista lateral, la superficie de la lámina porosa se hace difícil de confirmar de forma visual. Como resultado, se hace difícil determinar la presencia o ausencia de la indicación indicativa de la detección del ácido nucleico diana (un segundo problema de la técnica convencional).

15 Parece no haber problema siempre y cuando la tira se gire hacia el frente mediante la manipulación de la tira durante la observación. Sin embargo, cuando la lámina porosa se toca durante la manipulación, la lámina porosa se contamina y el color podría no aparecer aunque el ácido nucleico diana esté capturado. Como resultado, en la muestra de ensayo en que el ácido nucleico diana está presente podría determinarse erróneamente que el ácido nucleico diana no está presente. De forma adicional, la tira de la herramienta de inspección para cromatografía de ácidos nucleicos tiene la ventaja importante de que permite la inspección simultánea y de forma simple de múltiples muestras de ensayo, como se describe anteriormente. Por lo tanto, el ajuste de las direcciones de las tiras una por una mediante la manipulación estropea significativamente esta importante ventaja.

25 A la vista del primer problema de las técnicas convencionales mencionadas anteriormente, un objetivo de una primera invención de la presente solicitud es proporcionar una técnica que permita determinar de forma simple la presencia o ausencia del ácido nucleico diana, también en el caso en que la concentración del ácido nucleico diana en la muestra de ensayo sea baja.

30 En vista del segundo problema de las técnicas convencionales mencionadas anteriormente, un objetivo de una segunda invención de la presente solicitud es proporcionar una técnica que permita determinar de forma simple la presencia o ausencia de la indicación indicativa de la detección de un ácido nucleico diana, también en el caso en que la herramienta de inspección para cromatografía de ácidos nucleicos se observe desde una dirección distinta de la vista frontal.

### 35 Medios para resolver el problema

La presente invención es la herramienta de inspección para cromatografía de ácidos nucleicos siguiente.

40 [1] Una herramienta de inspección para cromatografía de ácidos nucleicos incluye: una lámina porosa alargada que expande una muestra líquida que contiene un ácido nucleico diana y detecta el ácido nucleico diana de forma que se indique la detección; y un elemento de refuerzo que tiene una superficie unida en donde la lámina porosa está unida. La lámina porosa tiene una superficie que incluye una superficie de detección. La superficie de detección incluye una porción de indicación con forma de tira en donde está fijada una sonda de ácido nucleico para la captura del ácido nucleico diana. La porción de indicación se extiende en un ángulo para intersectarse con una dirección longitudinal de la lámina porosa. La superficie unida tiene una forma cóncava. La lámina porosa tiene una forma combada que sigue la forma cóncava de la superficie unida.

[2] En la herramienta de inspección para cromatografía de ácidos nucleicos de acuerdo con [1] descrito anteriormente, la superficie de unión tiene una forma cóncava en una sección transversal que es paralela a la dirección longitudinal de la lámina porosa y paralela a una dirección de grosor de la lámina porosa.

50 [3] En la herramienta de inspección para cromatografía de ácidos nucleicos de acuerdo con [1] o [2] descritos anteriormente, la superficie de detección tiene un diámetro de apertura promedio más pequeño que un diámetro de apertura promedio en una superficie en el lado de la superficie unida de la lámina porosa en asociación con la deformación de la lámina porosa.

[4] En la herramienta de inspección para cromatografía de ácidos nucleicos de acuerdo con cualquiera de [1] a [3] descritos anteriormente, el elemento de refuerzo es una placa alargada, y una dirección longitudinal del elemento de refuerzo es paralela a la dirección longitudinal de la lámina porosa.

[5] En la herramienta de inspección para cromatografía de ácidos nucleicos de acuerdo con cualquiera de [1] a [4] descritos anteriormente, la lámina porosa está combada con una curvatura.

60 [6] En la herramienta de inspección para cromatografía de ácidos nucleicos de acuerdo con [5] descrito anteriormente, la lámina porosa tiene un valor de depresión de 1,0 a 5,0 mm.

[7] En la herramienta de inspección para cromatografía de ácidos nucleicos de acuerdo con cualquiera de [1] a [6] descritos anteriormente, el elemento de refuerzo tiene una superficie en el lado opuesto de la cara unida en una forma protuberante complementaria a la forma cóncava de la superficie unida de forma que está arqueada.

65 [8] Un conjunto de herramientas de inspección para cromatografía de ácidos nucleicos incluye: una pluralidad de las herramientas de inspección para cromatografía de ácidos nucleicos de acuerdo con cualquiera de [1] a [7] descritos anteriormente; y una caja de embalaje que aloja la herramienta de inspección para cromatografía de

ácidos nucleicos.

[9] Un conjunto de herramientas de inspección para cromatografía de ácidos nucleicos incluye: una pluralidad de las herramientas de inspección para cromatografía de ácidos nucleicos de acuerdo con [7] descrito anteriormente; y una caja de embalaje que aloja la herramienta de inspección para cromatografía de ácidos nucleicos. Los respectivos elementos de refuerzo de la pluralidad de las herramientas de inspección para cromatografía de ácidos nucleicos se arquean con distintas curvaturas.

[10] Una herramienta de inspección para cromatografía de ácidos nucleicos incluye: una lámina porosa alargada que expande una muestra líquida que contiene un ácido nucleico diana y detecta el ácido nucleico diana de forma que se indique la detección; y un elemento de refuerzo en donde la lámina porosa está unida. La lámina porosa tiene una superficie que incluye una superficie de detección. La superficie de detección incluye una porción de indicación con forma de tira en donde está fijada una sonda de ácido nucleico para la captura del ácido nucleico diana. La porción de indicación se extiende con un ángulo para intersectarse con una dirección longitudinal de la lámina porosa. En una sección transversal de la porción de indicación tomada perpendicularmente a la superficie de detección y a lo largo de una dirección de extensión de la porción de indicación, una porción distinta de ambas porciones de los extremos de la porción de indicación sobresale con respecto a una línea de referencia que acopla ambas porciones de los extremos de la porción de indicación.

[11] En la herramienta de inspección para cromatografía de ácidos nucleicos de acuerdo con [10] descrito anteriormente, en la sección transversal perpendicular a la dirección longitudinal de la lámina porosa, la superficie de detección sobresale mientras presenta una curvatura.

[12] En la herramienta de inspección para cromatografía de ácidos nucleicos de acuerdo con [10] o [11] descritos anteriormente, en la porción de indicación la sonda de ácido nucleico está fijada a una densidad más alta en una región que tiene una anchura predeterminada desde cada una de las porciones de los extremos de la porción de indicación hacia un centro, en comparación con una región residual en la misma porción de indicación.

[13] En la herramienta de inspección para cromatografía de ácidos nucleicos de acuerdo con cualquiera de [10] a [12] descritos anteriormente, en la porción de indicación la lámina porosa tiene un diámetro de apertura promedio más pequeño en una región que tiene una anchura predeterminada desde cada una de ambas de las porciones de los extremos de la porción de indicación hacia un centro, en comparación con una región residual en la misma porción de indicación.

### 30 Efecto de la invención

De acuerdo con la primera invención (las invenciones descritas en [1] a [9] anteriores) de la presente solicitud, el elemento de refuerzo de la herramienta de inspección para cromatografía de ácidos nucleicos tiene la superficie unida en la forma cóncava. La lámina porosa tiene la forma curvada que sigue la forma cóncava de esta superficie unida y, por consiguiente, en la porción de indicación los ácidos nucleicos diana están capturados mientras se los agrupan de forma más densa. Como resultado, es probable que aparezca un intenso color de indicación, indicativo de la detección del ácido nucleico diana. Es decir, de acuerdo con la primera invención (las invenciones descritas en [1] a [9] anteriores) de la presente solicitud, dado que es probable que aparezca un intenso color de indicación, indicativo de la detección del ácido nucleico diana, es posible determinar de forma simple la presencia o ausencia del ácido nucleico diana también en el caso en que la concentración del ácido nucleico diana en la muestra de ensayo sea baja.

De acuerdo con la segunda invención, (las invenciones descritas en [10] a [13] anteriores) de la presente solicitud, en la porción de indicación que indica la detección del ácido nucleico diana, la porción distinta de ambas de las porciones de los extremos, sobresale en comparación con ambas porciones de los extremos de la porción de indicación. Por consiguiente, una parte de la porción de indicación es visible como una superficie también en el caso en que la herramienta de inspección para cromatografía de ácidos nucleicos se observe desde la dirección que no sea la vista frontal. Como resultado, es posible determinar de forma simple la presencia o ausencia de la indicación indicativa de la detección del ácido nucleico diana.

### 50 Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1A es una vista frontal que muestra de forma esquemática una realización de una herramienta de inspección para cromatografía de ácidos nucleicos de acuerdo con una primera invención;

La FIG. 1B es una vista lateral esquemática de una herramienta de inspección para cromatografía de ácidos nucleicos vista desde la dirección de una flecha delineada  $V_L$ , mostrada en la FIG. 1A;

La FIG. 2 es un diagrama explicativo que muestra de forma esquemática el estado en que los ácidos nucleicos diana están capturados en una porción de indicación cuando se utiliza la herramienta de inspección para cromatografía de ácidos nucleicos mostrada en la FIG. 1A;

La FIG. 3 es un diagrama esquemático que muestra un modo de uso de la herramienta de inspección para cromatografía de ácidos nucleicos mostrada en la FIG. 1A;

La FIG. 4 es una vista lateral esquemática que muestra otra realización de la herramienta de inspección para cromatografía de ácidos nucleicos de acuerdo con la primera invención;

La FIG. 5 es un diagrama esquemático que muestra una realización de un conjunto de herramientas de inspección para cromatografía de ácidos nucleicos de acuerdo con la primera invención;

La FIG. 6A es una vista frontal que muestra de forma esquemática una realización de una herramienta de

inspección para cromatografía de ácidos nucleicos de acuerdo con una segunda invención;

La FIG. 6B es una vista lateral esquemática de una herramienta de inspección para cromatografía de ácidos nucleicos vista desde la dirección de una flecha delineada  $V_L$ , mostrada en la FIG. 6A;

La FIG. 7 es un diagrama esquemático de la sección transversal A-A' en la FIG. 6A;

5 La FIG. 8A es una vista frontal que muestra de forma esquemática un modo de uso de la herramienta de inspección para cromatografía de ácidos nucleicos mostrada en la FIG. 6A;

La FIG. 8B es una vista lateral que muestra de forma esquemática un modo de uso de la herramienta de inspección para cromatografía de ácidos nucleicos vista desde la dirección de una flecha delineada  $V_L$ , mostrada en la FIG. 8A;

10 La FIG. 9 es una vista frontal que muestra de forma esquemática otra realización de la herramienta de inspección para cromatografía de ácidos nucleicos de acuerdo con una segunda invención;

La FIG. 10 es un diagrama esquemático de una sección transversal B-B' en la FIG. 9;

La FIG. 11 es una vista lateral esquemática de la herramienta de inspección para cromatografía de ácidos nucleicos vista desde la dirección mostrada en una flecha delineada  $V_L$ , en la FIG. 9;

15 La FIG. 12 es un diagrama explicativo que muestra la descripción de la aplicación puntual de las soluciones de sonda de ADN de captura; y

La FIG. 13 es un diagrama explicativo de un procedimiento de expansión y de un procedimiento de detección.

### Modo de llevar a cabo la invención

20 En lo sucesivo en el presente documento, las realizaciones de la presente invención se describirán con referencia a los dibujos. La presente invención no se limita a las siguientes realizaciones, y pueden añadirse cambios, modificaciones y mejoras a las realizaciones, sin apartarse del punto esencial de la presente invención.

25 1. Primera invención:

La FIG. 1A es una vista frontal que muestra de forma esquemática una realización de una herramienta de inspección para cromatografía de ácidos nucleicos de acuerdo con la primera invención de la presente solicitud. La FIG. 1B es una vista lateral esquemática de una herramienta de inspección 1a para cromatografía de ácidos nucleicos vista desde la dirección de una flecha delineada  $V_L$ , mostrada en la FIG. 1A. La herramienta de inspección 1a para cromatografía de ácidos nucleicos de acuerdo con la presente realización incluye una lámina porosa 10 en una forma alargada y un elemento de refuerzo 20. Además, la herramienta de inspección 1a para cromatografía de ácidos nucleicos de acuerdo con la presente realización incluye una capa absorbente 40.

30 En primer lugar, la herramienta de inspección 1a para cromatografía de ácidos nucleicos de acuerdo con la presente realización incluye una superficie de detección 13 en la superficie de la lámina porosa 10. En la superficie de detección 13, aparece una indicación cuando se detecta un ácido nucleico diana. En esta superficie de detección 13 está dispuesta una porción de indicación 15. La porción de indicación 15 es una región con forma de tira que se extiende a un ángulo para intersectarse con la dirección longitudinal X de la lámina porosa 10. Dentro de esta región con forma de tira, está fijada una sonda de ácidos nucleicos para la captura del ácido nucleico diana.

35 De forma adicional, como se muestra en la FIG. 1B, la herramienta de inspección 1a para cromatografía de ácidos nucleicos de acuerdo con la presente realización incluye una superficie unida con forma cóncava 25 sobre el elemento de refuerzo 20. La lámina porosa 10 está unida a la superficie unida 25 en una forma combada mientras sigue la forma cóncava de esta superficie de unión 25. Por consiguiente, en la lámina porosa 10, la superficie de detección 13 y la porción de indicación 15, que es una parte de la región de la superficie de detección 13, también tienen formas arqueadas.

40 La FIG. 2 es un diagrama explicativo que muestra de forma esquemática el estado en que los ácidos nucleicos diana 60 están capturados en la porción de indicación 15 cuando se utiliza la herramienta de inspección 1a para cromatografía de ácidos nucleicos mostrada en la FIG. 1A. Como se muestra en el dibujo, en la herramienta de inspección 1a para cromatografía de ácidos nucleicos de acuerdo con la presente realización, la porción de indicación 15 tiene la forma arqueada. Por consiguiente, los ácidos nucleicos diana 60 capturados en la porción de indicación 15, en particular, las porciones distantes de la porción de indicación 15 en el ácido nucleico diana 60 se agrupan. Como resultado, los respectivos colorantes 65 que marcan los ácidos nucleicos diana 60 están densamente agrupados. Esta agrupación densa de los colorantes 65 es probable que provoque que aparezca una señal (color) intensa y definida, indicativa de la detección del ácido nucleico diana 60 en la porción de indicación 15 en la herramienta de inspección 1a para cromatografía de ácidos nucleicos de acuerdo con la presente realización.

45 En la herramienta de inspección 1a para cromatografía de ácidos nucleicos de acuerdo con la presente realización, es preferente que la superficie unida 25 tenga una forma cóncava en la sección transversal que es paralela a la dirección longitudinal X de la lámina porosa 10 y paralela a la dirección de grosor Z de la lámina porosa 10. En el caso en que la superficie unida 25 tenga la forma deprimida como una forma de arco a lo largo de la dirección longitudinal X, como se describe anteriormente, los ácidos nucleicos diana 60 se agrupan desde el lateral hacia el centro de la porción de indicación con forma de tira 15. Por consiguiente, la señal (color) indicativa de la detección del ácido nucleico diana 60 es probable que aparezca como una banda nítida.

En la herramienta de inspección 1a para cromatografía de ácidos nucleicos de la presente realización, los respectivos ácidos nucleicos diana 60 capturados en la porción de indicación 15 están se agrupan más. Como resultado, los respectivos colorantes 65 que marcan los ácidos nucleicos diana 60 se agrupan de forma más densa. Por consiguiente, es preferente que el diámetro de apertura promedio en la superficie de detección 13 sea más pequeño que el diámetro de apertura promedio en la superficie del lateral de la superficie unida 25 de la lámina porosa 10 en asociación con la deformación de la lámina porosa 10.

La FIG. 3 es un diagrama esquemático que muestra un modo de uso de la herramienta de inspección 1a para cromatografía de ácidos nucleicos mostrada en la FIG. 1A. Como se muestra en el dibujo, la herramienta de inspección 1a para cromatografía de ácidos nucleicos de acuerdo con la presente realización puede utilizarse de forma que, por ejemplo, se sumerja una porción del extremo distal 45 de la herramienta de inspección 1a para cromatografía de ácidos nucleicos en una muestra de ensayo líquida 55 contenida en un tubo de ensayo 50. Por lo tanto, cuando la porción del extremo distal 45 se sumerge en la muestra de ensayo 55, la muestra de ensayo 55 se expande dentro en la lámina porosa 10 debido a la capilaridad y es transportada a otra porción del extremo distal (la porción del extremo distal en donde se dispone la capa absorbente 40). En este momento, cuando el ácido nucleico diana está contenido en la muestra de ensayo 55, la sonda de ácido nucleico fijada en la porción de indicación 15 captura este ácido nucleico diana. Como resultado, el colorante para el marcaje del ácido nucleico diana colorea la porción de indicación 15 (véanse las porciones de indicación 15a y 15b en la FIG. 3).

Como se muestra en la FIG. 3, en la herramienta de inspección 1a para cromatografía de ácidos nucleicos de acuerdo con la presente realización, la superficie de detección 13 está dividida en tres áreas a lo largo de la dirección longitudinal X por dos indicadores de posición 14a y 14b. En estas tres áreas están dispuestas una a una las respectivas porciones de indicación 15a a 15c. A las porciones de indicación 15a a 15c están fijadas las respectivas sondas de ácido nucleico para capturar distintos tipos de ácido nucleico diana (ácidos nucleicos diana con distintas secuencias de bases). Por ejemplo, una sonda de ácido nucleico para un ácido nucleico diana como marcador de una enfermedad alérgica está fijada a la porción de indicación 15a, una sonda de ácido nucleico para un ácido nucleico diana como marcador tumoral está fijada a la porción de indicación 15b y una sonda de ácido nucleico para un ácido nucleico diana como marcador de una infección vírica está fijada a la porción de indicación 15c. Esto permite determinar si la persona padece o no los tres tipos de enfermedades anteriormente descritas mediante una inspección. Asumiendo que esta configuración se aplica al ejemplo mostrado en la FIG. 3, con respecto al paciente del que se obtiene la muestra de ensayo 55 en la FIG. 3, los colores se observan en las porciones de indicación 15a y 15b mientras que no se observa color en la porción de indicación 15c. Se determina que el paciente padece una enfermedad alérgica y una tumoral pero no padece una infección vírica.

En la herramienta de inspección 1a para cromatografía de ácidos nucleicos de acuerdo con la presente realización, las porciones de indicación 15a a 15c se extienden cada una en una línea recta a lo largo de la dirección de ancho Y perpendicular a la dirección longitudinal X. En la presente realización, la porción de indicación 15 no necesita extenderse en una línea recta a lo largo de la dirección de ancho Y de la lámina porosa 10. Solo es necesario disponer la porción de indicación de forma que la muestra de ensayo 55 atraviese la porción de indicación 15 en el transcurso de la expansión de la muestra de ensayo 55 en la lámina porosa 10. Aunque la ilustración se omite en el presente documento, por ejemplo, la porción de indicación 15 puede hacer uso de cualquier forma tal como una forma de tira que se extiende a un ángulo que interseca con la dirección longitudinal X a 45 grados y una forma de tira sinuosa (por ejemplo, véase la FIG. 9).

La herramienta de inspección 1a para cromatografía de ácidos nucleicos de acuerdo con la presente realización incluye la capa absorbente 40, que está en contacto con una parte de la lámina porosa 10 y absorbe la muestra de ensayo 55 que se ha expandido en la lámina porosa 10. En el caso en que la capa absorbente 40 está dispuesta como la herramienta de inspección 1a para cromatografía de ácidos nucleicos de acuerdo con la presente realización, la capa absorbente 40 puede absorber y retener la muestra de ensayo 55 que se ha expandido en la lámina porosa 10. Esto permite aumentar la cantidad de líquido de la muestra de ensayo 55 a expandir en la lámina porosa 10. Por lo tanto, esto también permite aumentar la cantidad del ácido nucleico diana aplicada a la herramienta de inspección 1a para cromatografía de ácidos nucleicos. Como resultado, la cantidad del ácido nucleico diana a capturar en la porción de indicación 15 se aumenta y la señal (color) indicativa de la detección del ácido nucleico diana parece ser intensa. Por lo tanto, esta configuración es preferente.

En la herramienta de inspección 1a para cromatografía de ácidos nucleicos de acuerdo con la presente realización, todo o una parte del ácido nucleico diana se prepara para tener una estructura de polinucleótido monocatenaria cuando la muestra de ensayo 55 se expande en la lámina porosa 10. De forma adicional, la sonda de ácidos nucleicos a utilizar al menos de forma parcial tiene una estructura de polinucleótidos monocatenario (un polinucleótido monocatenario con la secuencia de bases complementaria a la secuencia de bases del polinucleótido monocatenario del ácido nucleico diana) que puede hibridarse de forma específica con la estructura de polinucleótido monocatenaria del ácido nucleico diana. Con el uso de estos ácido nucleico diana y sonda de ácido nucleico, cuando el ácido nucleico diana alcanza la porción de indicación 15, la estructura de polinucleótido monocatenaria del ácido nucleico diana y la estructura de polinucleótido monocatenaria de la sonda de ácido nucleico se hibridan entre sí (forman una doble cadena). Después, el ácido nucleico diana se fija a la porción de indicación 15 a través de la sonda de ácido nucleico. En este caso, en la herramienta de inspección 1a para

5 cromatografía de ácidos nucleicos de acuerdo con la presente realización, la sonda de ácido nucleico no está limitada de forma específica y puede ser, por ejemplo, una sonda de ADN, una sonda de ARN, un oligonucleótido antisentido morfolino en la medida en que la sonda de ácido nucleico tiene la estructura de polinucleótido monocatenaria que puede hibridarse de forma específica con la estructura de polinucleótido monocatenaria del ácido nucleico diana.

10 De forma adicional, el ácido nucleico diana también puede emplear un ADN monocatenario, un ADN o ARN que tenga una porción en el extremo en una estructura monocatenaria, y similar. Un método disponible de forma general solo necesita aplicarse al marcaje del ácido nucleico diana. En el caso en que el ácido nucleico diana se prepara utilizando el método de PCR, es posible utilizar un método para marcar de forma directa un producto de PCR utilizando al menos uno de los dNTP (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) marcado con anterioridad, como sustratos para la reacción de polimerasa. Como alternativa, es posible utilizar un método para añadir posteriormente un marcador a un producto de PCR (ADN bicatenario) sin marcador. El método para añadir posteriormente un marcador a un producto de PCR (ADN bicatenario) sin un marcador puede emplear, por ejemplo, un cebador de PCR que esté modificado de forma que ambos extremos del producto de PCR tengan estructuras de polinucleótido monocatenarias de secuencias de base específicas. Este cebador de PCR modificado se utiliza para obtener un producto de PCR y la estructura de polinucleótido monocatenaria del producto de PCR obtenido se hibrida con un polinucleótido monocatenario marcado que tiene la secuencia de bases complementaria a esta estructura. Como resultado de esta hibridación, el ácido nucleico diana (producto de PCR) puede marcarse.

20 En la herramienta de inspección 1a para cromatografía de ácidos nucleicos de acuerdo con la presente realización, la lámina porosa 10 puede emplear una lámina con un sinfín de poros fabricada de nitrocelulosa, celulosa, polietersulfona, nylon, PVDF y similar.

25 Al igual que la herramienta de inspección 1a para cromatografía de ácidos nucleicos de acuerdo con la presente realización, es preferente que la forma del elemento de refuerzo 20 sea una forma de placa alargada y es preferente que la dirección longitudinal X del elemento de refuerzo 20 sea paralela a la dirección longitudinal X de la lámina porosa 10. Por lo tanto, la herramienta de inspección 1a para cromatografía de ácidos nucleicos está formada como una tira compacta, siendo así excelente en la capacidad de manipulación.

30 En la herramienta de inspección 1a para cromatografía de ácidos nucleicos de acuerdo con la presente realización, es preferente que la lámina porosa 10 esté combada con una curvatura debido a que es probable que la muestra de ensayo 55 se expanda de forma uniforme en la lámina porosa 10 y, como resultado, se hace menos probable que la señal (color) que aparece en la porción de indicación 15 que tenga irregularidades. En este caso, "combado con una curvatura" significa el estado en que la lámina porosa tiene una forma de arco en la vista transversal.

40 En la herramienta de inspección 1a para cromatografía de ácidos nucleicos de acuerdo con la presente realización, en el caso en que la lámina porosa 10 esté combada con una curvatura, es preferente que el valor de depresión de la lámina porosa 10 sea de 1,0 a 5,0 mm debido a que la señal (color) que aparece en la porción de indicación 15 se haga más fiablemente menos probable que tenga irregularidad. Además, es más preferente que el valor de depresión sea de 2,0 a 5,0 mm debido a que se potencia la capacidad de manipulación. Además, en particular, el valor de depresión es más preferente que sea de 2,0 a 4,0 mm debido a que la señal (color) que aparece en la porción de indicación 15 se haga más intensa. En la descripción con referencia a la FIG. 4, "el valor de depresión de la lámina porosa" en la presente descripción significa que el valor de una profundidad D de la depresión en la lámina porosa a medir a lo largo de la dirección perpendicular a la dirección longitudinal [la dirección a lo largo de la cual se mide la longitud máxima del elemento de refuerzo 20 en el caso en que la longitud se mida con una escala de vernier (la dirección longitudinal X en el ejemplo de la FIG. 4)], del elemento de refuerzo 20 descrito anteriormente.

50 Además, en la herramienta de inspección 1a para cromatografía de ácidos nucleicos de acuerdo con la presente realización, es preferente que la longitud de la lámina porosa 10 sea de 15 a 100 mm y el valor de depresión sea de 1,0 a 5,0 mm debido a que la señal (color) que aparece en la porción de indicación 15 se hace más intensa. De forma adicional, es más preferente que la longitud de la lámina porosa 10 sea de 30 a 60 mm y que el valor de depresión sea de 1,0 a 4,0 mm. En particular, es más preferente que la longitud de la lámina porosa 10 sea de 40 a 50 mm y el valor de depresión sea de 1,0 a 3,0 mm. La longitud de la lámina porosa en la presente descripción significa la longitud de la línea central trazada sobre la lámina porosa a lo largo de la dirección longitudinal sobre la superficie (la superficie de detección) de la lámina porosa.

60 La FIG. 4 es una vista lateral esquemática que muestra otra realización de la herramienta de inspección para cromatografía de ácidos nucleicos de acuerdo con la primera invención. En una herramienta de inspección 1b para cromatografía de ácidos nucleicos de acuerdo con la presente realización, el elemento de refuerzo 20 está arqueado debido a una superficie posterior 27 (la superficie del elemento de refuerzo 20 en el lado opuesto de la superficie unida 25) tiene una forma protuberante complementaria a la forma cóncava de la superficie unida 25. En la herramienta de inspección 1b para cromatografía de ácidos nucleicos de acuerdo con la presente realización, cuando la superficie posterior 27 del elemento de refuerzo 20 está colocada en una mesa de laboratorio plana, se produce un espacio libre entre: ambos extremos de la herramienta de inspección 1b para cromatografía de ácidos nucleicos y la mesa de laboratorio debido a que el elemento de refuerzo 20 está arqueado. Este espacio libre

facilita la sujeción de la herramienta de inspección 1b para cromatografía de ácidos nucleicos. Esta facilidad de sujeción permite evitar que se toque de forma errónea y se contamine la superficie de detección 13 de la herramienta de inspección 1b para cromatografía de ácidos nucleicos, previniendo así la determinación errónea debida a la contaminación de la superficie de detección 13.

5 La FIG. 5 es un diagrama esquemático que muestra una realización de un conjunto de herramientas de inspección para cromatografía de ácidos nucleicos de acuerdo con la primera invención. Como se muestra en el dibujo, un conjunto de herramientas de inspección 75 para cromatografía de ácidos nucleicos de acuerdo con la presente realización incluye la herramienta de inspección 1 para cromatografía de ácidos nucleicos descrita anteriormente y una caja de embalaje 70, que aloja la herramienta de inspección 1 para cromatografía de ácidos nucleicos.

15 En particular, el conjunto de herramientas de inspección 75 para cromatografía de ácidos nucleicos de acuerdo con la presente realización incluye una pluralidad de herramientas de inspección 1 para cromatografía de ácidos nucleicos cuyos elementos de refuerzo 20 están arqueados. Además, es preferente que los respectivos elementos de refuerzo 20 de esta pluralidad de herramientas de inspección 1 para cromatografía de ácidos nucleicos estén arqueados con distintas curvaturas. Como se acaba de describir, en el caso en que los respectivos elementos de refuerzo 20 de las herramientas de inspección 1 para cromatografía de ácidos nucleicos estén arqueados con distintas curvaturas, se produce en la caja de embalaje 70 un espacio entre las respectivas herramientas de inspección 1 para cromatografía de ácidos nucleicos adyacentes. Como resultado, esto facilita coger una a una las herramientas de inspección 1 para cromatografía de ácidos nucleicos de la caja de embalaje 70. En el caso en que los elementos de refuerzo 20 de la herramienta de inspección 1 para cromatografía de ácidos nucleicos estén arqueados con distintas curvaturas, se produce un espacio entre la superficie posterior 27 del elemento de refuerzo 20 y una pared interna 73 de la caja de embalaje 70. Esto facilita coger la herramienta de inspección 1 para cromatografía de ácidos nucleicos de la caja de embalaje 70.

25 2. Segunda invención:

30 La FIG. 6A es una vista frontal esquemática que muestra una realización de una herramienta de inspección para cromatografía de ácidos nucleicos de acuerdo con la segunda invención de la presente solicitud. La FIG. 6B es una vista lateral esquemática de una herramienta de inspección 101a para cromatografía de ácidos nucleicos observada desde la dirección (el lateral) de una flecha delineada  $V_L$ , mostrada en la FIG. 6A. La herramienta de inspección 101a para cromatografía de ácidos nucleicos de acuerdo con la presente realización incluye una lámina porosa 110 en una forma alargada y un elemento de refuerzo 120. Además, la herramienta de inspección 101a para cromatografía de ácidos nucleicos de acuerdo con la presente realización incluye una capa absorbente 140.

35 En primer lugar, la herramienta de inspección 101a para cromatografía de ácidos nucleicos de acuerdo con la presente realización incluye una superficie de detección 113 en la superficie de la lámina porosa 110. En la superficie de detección 113 aparece una indicación cuando se detecta un ácido nucleico diana. En esta superficie de detección 113 se dispone una porción de indicación 115. La porción de indicación 115 es una región con forma de tira que se extiende en un ángulo que interseca con la dirección longitudinal X de la lámina porosa 110. Dentro de esta región con forma de tira está fijada una sonda de ácido nucleico para capturar el ácido nucleico diana. Además, en la herramienta de inspección 101a para cromatografía de ácidos nucleicos de acuerdo con la presente realización, la lámina porosa 110 está unida a una superficie unida 125 del elemento de refuerzo 120.

45 La FIG. 7 es un diagrama esquemático de la sección transversal A-A' en la FIG. 6A. Esta sección transversal corresponde a la sección transversal de la porción de indicación 115 tomada de forma perpendicular a la superficie de detección 113 y a lo largo de la dirección de extensión de la porción de indicación 115. En este sección transversal, la porción distinta de ambas porciones de los extremos 118a y 118b de la porción de indicación 115 sobresale hacia el lado frontal con respecto a la línea de referencia (la línea punteada que conecta entre la porción del extremo 118a y la porción del extremo 118b en la FIG. 7) que conecta entre ambas porciones de los extremos 118a y 118b de la porción de indicación 115. Dado que la porción de indicación 115 sobresale así hacia el lado frontal, como se muestra en la FIG. 6B, una parte de la porción de indicación 115 es visible como una superficie también en el caso en que la herramienta de inspección 101a para cromatografía de ácidos nucleicos de acuerdo con la presente realización se observe desde la dirección (por ejemplo, el lado ilustrado por las flechas delineadas  $V_L$  en la FIG. 6A y la FIG. 7) distintas de la vista frontal. Como resultado, esto permite determinar de forma simple la presencia o ausencia de la indicación (color) indicativa de la detección del ácido nucleico diana.

60 Como se muestra en la FIG. 7, en la herramienta de inspección 101a para cromatografía de ácidos nucleicos de acuerdo con la presente realización, la lámina porosa 110 tiene la forma (forma abombada) cuyo grosor es más grande en la porción central y disminuye desde la porción central hacia ambos lados. La lámina porosa 110 que tiene esta forma se pone en contacto estrecho con la superficie unida plana 125, de forma que se forma la forma en que la superficie de detección 113 (y su región parcial de la porción de indicación 115) en la lámina porosa 110 sobresale hacia lado frontal.

65 En la herramienta de inspección 101a para cromatografía de ácidos nucleicos de acuerdo con la presente realización, es preferente que la superficie de detección 113 se proyecte hacia el lado frontal con una curvatura en la



sección transversal perpendicular a la dirección longitudinal de la lámina porosa 110. Como se acaba de describir, en el caso en que la superficie de detección 113 se proyecte hacia el lado frontal con la curvatura, es menos probable que se produzca un sombreado en la superficie de detección 113 y la señal (color) que aparece en la porción de indicación 115 se hace fácilmente visible. En este caso, "sobresale con la curvatura" significa que la superficie de detección de la lámina porosa tiene una forma de arco en la vista transversal.

Las FIG. 8A y FIG. 8B son diagramas esquemáticos que muestran un modo de uso de la herramienta de inspección 101a para cromatografía de ácidos nucleicos en la FIG. 6A. En este caso, la FIG. 8A es una vista frontal vista desde la misma dirección que la de la FIG. 6A, y la FIG. 8B es una vista lateral vista desde la misma dirección que la de la FIG. 6B. Como se muestra en el dibujo, la herramienta de inspección 101a para cromatografía de ácidos nucleicos de acuerdo con la presente realización se puede utilizar de forma que, por ejemplo, una porción del extremo distal 145 de la herramienta de inspección 101a para cromatografía de ácidos nucleicos se sumerge en una muestra de ensayo líquida 155 contenida en un tubo de ensayo 150. Por lo tanto, cuando la porción del extremo distal 145 se sumerge en la muestra de ensayo 155, la muestra de ensayo 155 se expande dentro la lámina porosa 110 debido a la capilaridad y se transporta a otra porción de extremo distal (la porción del extremo distal en donde la capa absorbente 140 está depositada). Al mismo tiempo, cuando el ácido nucleico diana está contenido en la muestra de ensayo 155, este ácido nucleico diana se captura mediante la sonda de ácido nucleico fijada a la porción de indicación 115. Como resultado, la porción de indicación 115 se colorea mediante el colorante para el marcaje del ácido nucleico diana (véanse las porciones de indicación 115a y 115b en las FIGS. 8A y 8B).

Como se muestra en el dibujo, en la herramienta de inspección 101a para cromatografía de ácidos nucleicos de acuerdo con la presente realización, la superficie de detección 113 está dividida en tres áreas a lo largo de la dirección longitudinal X por dos indicadores de posición 114a y 114b. En estas tres áreas, las respectivas porciones de indicación 115a a 115c están dispuestas una a una. A las porciones de indicación 115a a 115c, están fijadas las respectivas sondas de ácido nucleico para capturar distintos tipos de ácido nucleico diana (ácidos nucleicos diana con distintas secuencias de bases). Por ejemplo, una sonda de ácido nucleico para un ácido nucleico diana como un marcador de una enfermedad alérgica está fijada a la porción de indicación 115a, una sonda de ácido nucleico para un ácido nucleico diana como un marcador tumoral está fijada a la porción de indicación 115b y una sonda de ácido nucleico para un ácido nucleico diana como un marcador de una infección vírica está fijada a la porción de indicación 115c. Esto permite determinar si la persona padece o no los tres tipos de enfermedades descritos anteriormente mediante una inspección. Asumiendo que esta configuración se aplica al ejemplo mostrado en la FIG. 8A y la FIG. 8B, con respecto al paciente del cual se obtiene la muestra de ensayo 155 en la FIG. 8A y FIG. 8B, los colores se observan en las porciones de indicación 115a y 115b, mientras que no se observa color en la porción de indicación 115c. Por consiguiente, se determina que el paciente padece una enfermedad alérgica y un tumor pero no padece una enfermedad vírica.

En la herramienta de inspección 101a para cromatografía de ácidos nucleicos de acuerdo con la presente realización, las porciones de indicación 115a a 115c se extienden cada una en una línea recta a lo largo de la dirección de ancho Y perpendicular a la dirección longitudinal X. En la presente realización, la porción de indicación 115 no necesita extenderse en una línea recta a lo largo de la dirección de ancho Y de la lámina porosa 110. Es solo necesario disponer la porción de indicación de forma que la muestra de ensayo 155 atraviese la porción de indicación 115 en el transcurso de la expansión de la muestra de ensayo 155 en la lámina porosa 110. Por ejemplo, la porción de indicación 115 puede hacer uso de cualquier forma tal como una forma de tira que se extiende en un ángulo para intersectarse con la dirección longitudinal Y a 45 grados y una forma de tira sinuosa.

La herramienta de inspección 101a para cromatografía de ácidos nucleicos de acuerdo con la presente realización incluye la capa absorbente 140, la cual está en contacto con una parte de la lámina porosa 110 y absorbe la muestra de ensayo 155 que se ha expandido en la lámina porosa 110. En el caso en que la capa absorbente 140 está dispuesta como la herramienta de inspección 101a para cromatografía de ácidos nucleicos de acuerdo con la presente realización, la capa absorbente 140 puede absorber y retener la muestra de ensayo 155 que se ha expandido en la lámina porosa 110. Esto permite aumentar la cantidad de líquido de la muestra de ensayo 155 a expandir en la lámina porosa 110. Por lo tanto, esto también permite aumentar la cantidad de ácido nucleico diana aplicada a la herramienta de inspección 101a para cromatografía de ácidos nucleicos. Como resultado, la cantidad del ácido nucleico a capturar en la porción de indicación 115 se aumenta y la señal (color) indicativa de la detección del ácido nucleico diana parece ser intensa. Por lo tanto, esta configuración es preferente.

En la herramienta de inspección 101a para cromatografía de ácidos nucleicos de acuerdo con la presente realización, todo o una parte del ácido nucleico diana se prepara para tener una estructura de polinucleótido monocatenaria cuando la muestra de ensayo 155 se expande en la lámina porosa 110. De forma adicional, la sonda de ácido nucleico a utilizar tiene, al menos de forma parcial, una estructura de polinucleótido monocatenaria (un polinucleótido monocatenario con la secuencia de bases complementaria a la secuencia de bases del polinucleótido monocatenario del ácido nucleico diana) que puede hibridar de forma específica con la estructura de polinucleótido monocatenaria del ácido nucleico diana. Con el uso de estos ácido nucleico diana y sonda de ácido nucleico, cuando el ácido nucleico diana alcanza la porción de indicación 115, la estructura de polinucleótido monocatenaria del ácido nucleico diana y la estructura de polinucleótido monocatenaria de la sonda de ácido nucleico se hibridan entre sí (forman una doble cadena). Después, el ácido nucleico diana se fija a la porción de indicación 115 a través de la

sonda de ácido nucleico. En este caso, en la herramienta de inspección 101a para cromatografía de ácidos nucleicos de acuerdo con la presente realización, la sonda de ácido nucleico no está limitada de forma específica y puede ser, por ejemplo, una sonda de ADN, una sonda de ARN o un oligonucleótido antisentido morfolino en la medida en que la sonda de ácido nucleico tenga la estructura de polinucleótido monocatenaria que pueda hibridar de forma específica con la estructura de polinucleótido monocatenaria del ácido nucleico diana.

De forma adicional, el ácido nucleico diana también puede emplear un ADN monocatenario, un ADN o un ARN bicatenario que tenga una porción en el extremo en una estructura monocatenaria, y similar. Un método disponible de forma general solo necesita aplicarse al marcaje del ácido nucleico diana. En el caso en que el ácido nucleico diana se prepara utilizando el método de PCR, es posible utilizar un método para el marcaje de forma directa de un producto de PCR utilizando al menos uno de los dNTP (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) marcado con anterioridad como sustratos para la reacción de polimerasa. Como alternativa, es posible utilizar un método para añadir posteriormente un marcador a un producto de PCR (ADN bicatenario) sin marcador. El método para añadir posteriormente un marcador a un producto de PCR (ADN bicatenario) sin marcador puede emplear, por ejemplo, un cebador de PCR que esté modificado de forma que a ambos extremos del producto de PCR tengan estructuras de polinucleótido monocatenarias de secuencias de base específicas. Este cebador de PCR modificado se utiliza para obtener un producto de PCR y la estructura de polinucleótido monocatenaria del producto de PCR obtenido se hibrida con un polinucleótido monocatenario marcado que tiene la secuencia de bases complementaria a esta estructura. Con esta hibridación se puede marcar el ácido nucleico diana (producto de PCR).

En la herramienta de inspección 101a para cromatografía de ácidos nucleicos de acuerdo con la presente realización, la lámina porosa 110 puede emplear una lámina con un sinfín de poros fabricada de nitrocelulosa, celulosa, polietersulfona, nylon, PVDF y similar.

La FIG. 9 es una vista frontal que muestra de forma esquemática otra realización de la herramienta de inspección para cromatografía de ácidos nucleicos de acuerdo con la segunda invención. Como se muestra en el dibujo, en una herramienta de inspección 101b para cromatografía de ácidos nucleicos de acuerdo con la presente realización, las porciones de indicación 115d y 115e se doblan en una forma de S, y ambas porciones del extremo 118c y 118d de las porciones de indicación 115d y 115e no alcanzan los bordes laterales de la superficie de detección 113.

La FIG. 10 es un diagrama esquemático de la sección transversal B-B' en la FIG. 9. Esta sección transversal incluye la línea central de la porción de indicación 115d, como se ilustra mediante la línea punteada que conecta entre ambas porciones de los extremos 118c y 118d de la porción de indicación con forma de tira 115d en la FIG. 9. Como se muestra en el dibujo, en la herramienta de inspección 101b para cromatografía de ácidos nucleicos de acuerdo con la presente realización, la superficie de la parte superior del elemento de refuerzo con forma de lámina 120 curvado en una forma de arco se define como la superficie unida 125. A esta superficie unida 125 está unida la lámina porosa 110 con un grosor uniforme. Por consiguiente, en esta sección transversal, la porción distinta de las porciones de los extremos 118c y 118d de la porción de indicación 115d sobresale hacia el lado frontal con respecto a la línea de referencia (la línea punteada en la FIG. 10) que conecta entre ambas porciones de los extremos 118c y 118d de la porción de indicación 115d.

La FIG. 11 es una vista lateral de la herramienta de inspección 101b para cromatografía de ácidos nucleicos vista desde la dirección mostrada mediante una flecha delineada  $V_L$  en la FIG. 9 y FIG. 10. Como se describe anteriormente, la porción de indicación 115d se proyecta hacia el lado frontal. Por consiguiente, una parte de la porción de indicación 115d es visible como una superficie también en el caso en que la herramienta de inspección 101b para cromatografía de ácidos nucleicos de acuerdo con la presente realización se observa desde la dirección distinta de la vista frontal. Como resultado, esto permite determinar de forma simple la presencia o ausencia de la indicación (color) indicativa de la detección del ácido nucleico diana en la porción de indicación 115d.

Además, como se muestra en la FIG. 9, en la herramienta de inspección 101b para cromatografía de ácidos nucleicos de acuerdo con la presente realización, en la porción de indicación 115 (las porciones de indicación 115d y 115e), la sonda de ácido nucleico está fijada a una mayor densidad en las respectivas regiones que tienen una anchura predeterminada  $W$  desde ambas porciones de los extremos 118c y 118d hacia el centro en la porción de indicación 115, en comparación con la región residual en la misma porción de indicación 115. En la FIG. 9 y FIG. 11, la graduación de la densidad de la sonda de ácido nucleico se muestra mediante la densidad del sombreado en la porción de indicación 115d. Como se acaba de describir, cuando la sonda de ácido nucleico está fijada a una alta densidad en la región cerca de ambas porciones finales 118c y 118d de la porción de indicación 115, la señal (color) indicativa de la detección del ácido nucleico diana parece ser intensa en la región cerca de ambas porciones de los extremos 118c y 118d de la porción de indicación 115. Como resultado, como se muestra en la FIG. 11, en el caso en que la herramienta de inspección 101b para cromatografía de ácidos nucleicos se observa desde el lateral, la presencia de la señal (color) indicativa de la detección del ácido nucleico diana puede determinarse de forma simple incluso cuando sea visible solo la región cerca de la porción del extremo 118d de la porción de indicación 115. Asumiendo que esta configuración se aplica al ejemplo mostrado en la FIG. 11, también en el caso en que la herramienta de inspección 101b para cromatografía de ácidos nucleicos se observa desde el lateral, es posible determinar de forma simple que la señal (color) indicativa de la detección del ácido nucleico diana se produce en la porción de indicación 115d, mientras que la señal (color) no se produce en la porción de indicación 115e. En

particular, en la herramienta de inspección 101b para cromatografía de ácidos nucleicos de acuerdo con la presente realización, se supone la detección del ácido nucleico diana produce un color intenso en la vecindad de la porción del extremo 118d de la porción de indicación 115. Por consiguiente, cuando se reconoce el color cerca de la porción del extremo 118d de la porción de indicación 115 en la vista lateral, es posible determinar sin duda que el ácido nucleico diana no se detecta. Es decir, la herramienta de inspección 101b para cromatografía de ácidos nucleicos de acuerdo con la presente realización permite la determinación rápida de la presencia o ausencia del ácido nucleico diana.

En la herramienta de inspección 101 para cromatografía de ácidos nucleicos de acuerdo con la segunda invención, en las respectivas regiones con el ancho predeterminado W desde ambas porciones de los extremos 118c y 118d hacia el centro en la porción de indicación 115, es preferente que el diámetro de apertura promedio de la lámina porosa 110 sea más pequeño que el de la región residual en la misma porción de indicación 115. Como se acaba de describir, en el caso en que el diámetro de apertura promedio de la lámina porosa 110 sea pequeño en las regiones cerca de ambas porciones de los extremos 118c y 118d de la porción de indicación 115, los ácidos nucleicos diana se capturan en un estado densamente agrupado en estas regiones cerca de ambas porciones de los extremos 118c y 118d. Como resultado, la señal (color) indicativa de la detección del ácido nucleico diana parece ser intensa. Por lo tanto, esta configuración es preferente.

En este caso, en la herramienta de inspección 101 para cromatografía de ácidos nucleicos de acuerdo con la segunda invención, en algunos casos, la sonda de ácido nucleico está fijada a una alta concentración en las regiones cerca de ambas porciones de los extremos 118c y 118d en la porción de indicación 115, y el diámetro de apertura promedio de la lámina porosa 110 es pequeño en las regiones cerca de ambas porciones de los extremos 118c y 118d de la porción de indicación 115. En este caso, la región en donde la sonda de ácido nucleico está fijada a una alta concentración y la región en donde el diámetro de apertura promedio de la lámina porosa 110 es pequeño no necesitan coincidir completamente entre sí.

Con respecto a la lámina porosa 110, para preparar la lámina porosa 110 en donde las respectivas regiones con el ancho predeterminado W desde ambas porciones de los extremos 118c y 118d hacia el centro en la porción de indicación 115 tienen diámetros de apertura promedio más pequeños que el de la región residual en la misma porción de indicación 115, es preferente el procedimiento siguiente. En primer lugar, para formar la lámina porosa 110 en una forma alargada es preferente comprimir ambos bordes laterales (ambos bordes laterales en la dirección de ancho Y) (como alternativa, ambos bordes laterales y la porción cerca de los bordes laterales) de la lámina porosa 110 y después cortar la lámina porosa 110. Como alternativa, es preferente utilizar un método en el que el corte se realiza mientras se comprime. Como se acaba de describir, la compresión de ambos bordes laterales durante el corte de la lámina porosa 110 permite disminuir el diámetro de apertura promedio de la lámina porosa 110 en la porción en la periferia de ambos bordes laterales de la lámina porosa 110. De forma específica, es preferente utilizar un método para cortar ambos bordes laterales de la lámina porosa 110 utilizando una cuchilla de presión con borde de hoja sin filo y similar.

#### 40 Ejemplos

A continuación se describe la presente invención con más detalle a base de los ejemplos. La presente invención no se limita a estos ejemplos.

45 [Preparación de la herramienta de inspección para cromatografía de ácidos nucleicos]

Se unieron láminas de membrana Hi-Flow Plus de Merck Millipore (45 mm x 300 mm) (en lo sucesivo denominado en el presente documento "la lámina porosa") a tarjetas de membrana laminada de Merck Millipore (60 mm x 300 mm) (en lo sucesivo denominado en el presente documento "el elemento de refuerzo"), para preparar láminas compuestas. Posteriormente, de acuerdo con los siguientes procedimientos 1 a 7, se aplicaron de forma puntual soluciones de sonda de ADN de captura, que incluían las secuencias de bases mostradas en la Tabla 1, en las superficies de las láminas porosas de las láminas compuestas, utilizando un aplicador puntual GENESHOT (marca registrada) de NGK Insulators, Ltd., para fijar las sondas de ADN de captura a las superficies de las láminas porosas. Posteriormente, la lámina compuesta se procesó cortando en una forma alargada, para obtener una tira de una herramienta de inspección para cromatografía de ácidos nucleicos. En este caso, el aplicador puntual GENESHOT (R) es el dispositivo que utiliza una unidad de descarga (método de inyección de tinta) divulgada en el documento JP-A-2003-75305.

60 [Procedimiento 1: Preparación de la solución de sonda de ADN de captura]

Se sintetizaron nueve tipos de sondas de ADN de captura en conformidad con las secuencias de bases de la Tabla 1. Las soluciones acuosas en donde estas sondas de ADN de captura se disolvieron mediante tampón de Tris-EDTA se mezclaron con solución tamponadora SSC y azul de bromofenol (ABF), para preparar soluciones con azul de bromofenol al 0,05 % en peso y una concentración de sonda de ADN de captura de 2 a 60  $\mu$ M.

[Tabla 1]

Número de sonda	Secuencia (5' a 3')
1	TGTTCTCTGACCAATGAATCTGC
2	TGGAAGTGGGAACGCTTTAGATG
3	TTCGCTTCGTTGTAATTCGGAC
4	AGGCATCCTAAGAAATCGCTACT
5	TAGCCCAGTGATTTATGACATGC
6	AGGTCCGGTAGTAATTTAGGTGC
7	TATTCTACCAACGACATCACTGC
8	CATCTCCAAGAATTGACCCACCA
9	GAAGGATCGCTTTTATCTGGCAT

[Procedimiento 2: Examen de las condiciones de aplicación puntual]

5 Antes de la aplicación puntual en la superficie de la lámina porosa de la lámina compuesta, se realizó una aplicación puntual de comprobación en una lámina de comprobación para examinar las condiciones de aplicación puntual. De forma específica, la solución de sonda de ADN de captura se inyectó en el componente de inyección líquida dispuesto en la unidad de descarga del aplicador puntual GENESHOT (R) para realizar la aplicación puntual de comprobación en la lámina de comprobación. Se comprobó la calidad en la lámina de comprobación con respecto a cinco puntos de: (i) si no hay formación defectuosa de las aplicaciones puntuales; (ii) si las aplicaciones puntuales no tienen formas irregulares; (iii) si el diámetro de la aplicación puntual no cambia en un 10 % o más con respecto al valor planeado; (iv) si no hay aparición de aplicaciones puntuales innecesarias (las aplicaciones puntuales normalmente denominadas como "satélites") y (v) si la posición de la aplicación puntual no cambia en un tercio o más del diámetro de la aplicación puntual. Dado que la solución de sonda de ADN de captura se coloreó en azul mediante azul de bromofenol, para las aplicaciones puntuales descritas anteriormente (i) a (v) fue posible comprobar las aplicaciones puntuales en la lámina de comprobación mediante observación visual.

10 Como resultado de la comprobación de calidad descrita anteriormente, cuando se detecta un fallo en la aplicación puntual de comprobación, la señal de control para el dispositivo piezoeléctrico/electrostrictivo dispuesto en la unidad de descarga se ajustó para realizar otra vez la aplicación puntual de comprobación. La señal de control se ajustó cambiando el valor de tensión, el tiempo de aumento hasta una tensión predeterminada, el tiempo de mantenimiento del valor predeterminado de tensión y el tiempo de la caída de potencial. Cuando el fallo se seguía detectando se realizó la aplicación puntual de comprobación tras retirar la solución de sonda de ADN de captura de la unidad de descarga mediante succión al vacío y la solución de sonda de ADN de captura se inyectó otra vez en el componente de inyección líquida. La operación descrita anteriormente se repitió hasta que no se detectó una aplicación puntual errónea.

[Procedimiento 3: Aplicación puntual de la solución de sonda de ADN de captura]

30 Tras confirmar que no se detectaba la aplicación puntual errónea, la sonda de ADN de captura se aplicó de forma puntual en la superficie de la lámina porosa de la lámina compuesta utilizando el siguiente método. En primer lugar, se aplicó de forma puntual un tipo de solución de sonda de ADN de captura en un estado en que la unidad de descarga y la lámina porosa no estaban en contacto entre sí, de forma que: el paso de las aplicaciones puntuales se ajustó a 0,05 mm tanto en la dirección lateral [que corresponde a "la dirección de ancho Y" de un producto acabado] como en la dirección longitudinal [que corresponde a "la dirección longitudinal X" del producto acabado]; y las aplicaciones puntuales se dispusieron en una línea recta en la dirección lateral y la dirección longitudinal sobre la superficie de la lámina porosa. Por consiguiente, la línea (que corresponde a "la porción de indicación" del producto acabado), que tiene 300 mm en la dirección lateral y 0,5 mm en la dirección longitudinal, se formó sobre la superficie de la lámina porosa de la lámina compuesta. En concreto, la unidad de descarga se movió sobre la lámina porosa en una línea recta a lo largo de la dirección lateral [que corresponde a "la dirección de ancho Y" del producto acabado] de la lámina compuesta. Cuando la unidad de descarga alcanzó el punto final, la lámina compuesta se movió una fila o una pluralidad de filas en la dirección longitudinal [que corresponde a "la dirección longitudinal X" del producto acabado]. Posteriormente, la unidad de descarga se movió otra vez en una línea recta a lo largo de la dirección lateral [que corresponde a "la dirección de ancho Y" del producto acabado] de la lámina compuesta. Con estos procedimientos se formó la línea (que corresponde a "la porción de indicación" del producto acabado).

45 Antes de que la aplicación puntual de la sonda de ADN de captura descargada desde la unidad de descarga impacte y esta aplicación puntual se seque, puede producirse un corrimiento y una irregularidad del color cuando la siguiente aplicación puntual adyacente impacta y ambos puntos contactan entre sí. Por lo tanto, en primer lugar, la mitad anterior de la aplicación puntual se realizó con un paso de 0,1 mm en la dirección lateral [que corresponde a "la dirección de ancho Y" del producto acabado]. Posteriormente, en el modo en que una nueva aplicación puntual de la sonda de ADN de captura impactó contra el espacio libre entre las aplicaciones puntuales, la mitad posterior de la aplicación puntual se realizó con un paso de 0,1 mm. Como se acaba de describir, la formación de las filas de

aplicaciones puntuales a un paso de 0,05 mm aplicando de forma puntual por separado en la mitad anterior y la mitad posterior, permitió evitar el corrimiento y la irregularidad del color.

- 5 Como se muestra en la FIG. 12, la línea anteriormente descrita con una longitud de 300 mm x una ancho de 0,5 mm está formada de filas de aplicaciones puntuales y1 a y10, que están dispuestas en la dirección longitudinal de la línea [que corresponde a “la dirección longitudinal X” del producto acabado]. La línea con una longitud de 300 mm x una anchura de 0,5 mm puede formarse mediante la formación de filas de aplicaciones puntuales en el orden que corresponde a y1, y2, y3, y4, y5, y6, y7, y8, y9 e y10. Cuando la fila de puntos posterior solapa con la fila de puntos anterior antes de que se seque la fila de puntos anterior, puede producirse corrimiento e irregularidad del color en esta porción solapada. Por lo tanto, la aplicación puntual en el orden que corresponde a y1, y10, y2, y9, y3, y8, y4, y7, y5 e y6 permite evitar la situación en que la línea de puntos posterior solapa con la línea de puntos anterior antes de que la línea anterior de aplicaciones puntuales se seque. Como resultado, esto hizo posible inhibir la aparición de corrimiento mientras se ajustaba el ancho de la línea dentro de un intervalo de 0,45 a 0,55 mm (el valor planeado de 0,50 mm  $\pm$  el error de 0,05 mm). Además, con la aplicación puntual en el orden que corresponde a y1, y6, y2, y7, y3, y8, y4, y9, y5 e y10, o en el orden que corresponde a y1, y3, y5, y7, y9, y2, y4, y6, y8 e y10, la aplicación puntual para no formar filas de aplicaciones puntuales adyacentes en series permitió evitar la irregularidad de color en la línea además de ajustar el ancho de la línea debido al corrimiento dentro del intervalo de 0,45 mm a 0,55 mm (el valor planeado de 0,50 mm  $\pm$  el error de 0,05 mm).
- 10
- 15
- 20 Para finalizar, se formaron en la superficie de la lámina porosa de la lámina compuesta nueve líneas cada una (con un error de 0,1 mm o menos con respecto al valor planeado de ancho de línea) con una longitud de 300 mm x una anchura de 0,5 mm a un paso de 1,2 mm en la dirección longitudinal [que corresponde a “la dirección longitudinal X” del producto acabado]. Estas nueve líneas se formaron como sondas de ADN de captura (o números de sonda 1 a 9 en la Tabla 1) de tipos mutuamente distintos. Es decir, los respectivos nueve tipos de sondas de ADN de captura (de los números de sonda 1 a 9) se fijaron a distintas posiciones en la superficie de la lámina porosa.
- 25

[Procedimiento 4: Aplicación puntual de la línea de indicador de posición]

- 30 Para facilitar la determinación de la posición de la porción de indicación, se aplicó de forma puntual un líquido que contenía tinta magenta a base de pigmento para formar líneas del indicador de posición. En este caso, las líneas del indicador de posición se formaron mediante la aplicación puntual con un método similar al de la aplicación puntual de la solución de sonda de ADN de captura. Como resultado se obtuvo una lámina compuesta (véase la FIG. 13(a), que muestra un producto acabado obtenido mediante el procesamiento de esta lámina compuesta). En la lámina compuesta se dispusieron las nueve líneas [coloreadas mediante azul de bromofenol (ABF)] de la sonda de ADN de captura y las tres líneas (coloreadas mediante la tinta magenta a base de pigmento) del marcador de posición con un patrón a rayas.
- 35

[Procedimiento 5: Fijación de ADN de captura]

- 40 Tras la finalización de la formación de las líneas de la sonda de ADN de captura y de las líneas del indicador de posición a través del procedimiento 4, la lámina compuesta se calentó a 50 °C durante 30 minutos para fijar las sondas de ADN de captura a la superficie de la lámina porosa, para fijar a la superficie de la lámina porosa la tinta magenta a base de pigmento del indicador de posición.

- 45 [Procedimiento 6: Comprobación]

La lámina porosa de la lámina compuesta se comprobó con respecto a los puntos [(i) a (v)] de forma similar a la comprobación en el procedimiento 3 descrito anteriormente.

- 50 [Procedimiento 7: Procesamiento]

(Ejemplos 1 a 5)

- 55 Tras la comprobación del procedimiento 6 las láminas compuestas sin anomalías se procesaron por cualquier método de los siguientes métodos de procesamiento 1 a 3 para preparar tiras de las herramientas de inspección para cromatografía de ácidos nucleicos en formas arqueadas a lo largo de la dirección longitudinal, de forma que los valores de depresión de la lámina porosa tuvieran 1,0 mm (Ejemplo 1), 2,0 mm (Ejemplo 2), 3,0 mm (Ejemplo 3), 4,0 mm (Ejemplo 4) y 5,0 mm (Ejemplo 5) (véase el valor de D en la FIG. 4 para “los valores de depresión de la lámina porosas”).
- 60

[Método de procesamiento 1]

- 65 Se montó sobre la lámina porosa una capa absorbente Merck Millipore (20 mm x 300 mm) para cubrir aproximadamente 5 mm. Para fijar la capa absorbente, tras pegar de antemano una cinta adhesiva (25 mm x 300 mm) a la porción de la superficie de la parte superior de la capa absorbente, la porción protuberante de la cinta adhesiva se pegó a la lámina porosa mientras se halaba la porción protuberante de la cinta adhesiva en la dirección

longitudinal (que corresponde a “la dirección longitudinal X” del producto acabado) de la lámina compuesta. Este método proporciona una lámina compuesta con una lámina porosa arqueada y un elemento de refuerzo arqueado para reforzar esta lámina porosa (véase la FIG. 4 para la forma arqueada). Posteriormente, esta lámina compuesta se cortó utilizando una cortadora o una cuchilla de guillotina, para obtener 85 tiras (las herramientas de inspección para cromatografía de ácidos nucleicos) cada una con una anchura de 3,5 mm y una longitud de 60 mm (una longitud de 45 mm para la lámina porosa). En este caso, el valor de depresión de la lámina porosa fue de 1,0 a 5,0 mm.

[Método de procesamiento 2]

Se montó sobre la lámina porosa una capa absorbente Merck Millipore (20 mm x 300 mm) para cubrir aproximadamente 5 mm. Para fijar la capa absorbente se pegó a la lámina porosa una cinta adhesiva (25 mm x 300 mm). Se preparó un accesorio ajustado de forma que el valor de depresión de la lámina porosa se ajustara a 1,0 a 5,0 mm, de forma que la lámina compuesta se fijara a este accesorio. En este estado fijo, la lámina compuesta se cortó utilizando una cortadora o una cuchilla de guillotina para obtener 85 tiras (las herramientas de inspección para cromatografía de ácidos nucleicos), cada una con una anchura de 3,5 mm y una longitud de 60 mm (una longitud de 45 mm para la lámina porosa).

[Método de procesamiento 3]

Se montó sobre la lámina porosa una capa absorbente Merck Millipore (20 mm x 300 mm) para cubrir aproximadamente 5 mm. Para fijar la capa absorbente, se pegó a la lámina porosa una cinta adhesiva (25 mm x 300 mm). La lámina compuesta se cortó utilizando una cortadora o una cuchilla de guillotina para obtener 85 tiras, cada una con una anchura de 3,5 mm y una longitud de 60 mm (una longitud de 45 mm para la lámina porosa). Posteriormente, se aplicó una tensión apropiada a una porción del extremo distal o a ambas porciones de los extremos distales de estas tiras para arquear las tiras de forma que los valores de depresión de las láminas porosas tuvieran 1,0 a 5,0 mm, para obtener las tiras de las herramientas de inspección para cromatografía de ácidos nucleicos.

(Ejemplo comparativo 1)

[Método de procesamiento 4]

Se montó sobre la lámina porosa una capa absorbente Merck Millipore (20 mm x 300 mm) para cubrir aproximadamente 5 mm. Para fijar la capa absorbente, se pegó a la lámina porosa una cinta adhesiva (25 mm x 300 mm). La lámina compuesta se cortó utilizando una cortadora o una cuchilla de guillotina para obtener 85 tiras (las herramientas de inspección para cromatografía de ácidos nucleicos) cada una con una anchura de 3,5 mm y una longitud de 60 mm (una longitud de 45 mm para la lámina porosa). En este caso, las tiras obtenidas de las herramientas de inspección para cromatografía de ácidos nucleicos tenían láminas porosas planas, es decir, valores de depresión de 0,0 mm para las láminas porosas.

(Ejemplos 6 a 10)

Tras la comprobación del procedimiento 6, las láminas compuestas sin anomalías se procesaron con el siguiente método de procesamiento 5 o método de procesamiento 6 para preparar tiras de las herramientas de inspección para cromatografía de ácidos nucleicos de forma que las diferencias de altura (valor de protrusión) entre la porción central y la porción del borde en las láminas porosas fueran de 0,01 mm (Ejemplo 6), 0,03 mm (Ejemplo 7), 0,05 mm (Ejemplo 8), 0,07 mm (Ejemplo 9) y 0,10 mm (Ejemplo 10). En este caso, la diferencia de altura descrita anteriormente (valores de protrusión) es la distancia desde la línea de referencia que conecta la superficie de ambas porciones de los extremos de la lámina porosa hasta la superficie de la porción central de la lámina porosa con referencia al “valor de protrusión T” en la FIG. 7.

[Método de procesamiento 5]

Se montó sobre la lámina porosa una capa absorbente Merck Millipore (20 mm x 300 mm) para cubrir aproximadamente 5 mm. Para fijar la capa absorbente, se pegó una cinta adhesiva (25 mm x 300 mm) a una placa de membrana. Posteriormente, cuando la lámina compuesta se procesó utilizando una cortadora, la hoja de la cortadora se puso en contacto con la superficie de la lámina porosa y después se presionó la hoja sobre la lámina porosa para cortar la lámina compuesta. Esto permitió obtener tiras de las herramientas de inspección para cromatografía de ácidos nucleicos de forma que en la lámina porosa el grosor de la porción central fuese de 0,55 mm y que el grosor de ambas porciones del borde fuese de 0,45 mm. Es decir, se proporcionó una forma abombada, en donde en la lámina porosa la porción central se proyecta con respecto a ambas porciones de los extremos en 0,10 mm. Se repitió un trabajo similar para obtener a partir de una lámina compuesta 85 tiras, cada una con una anchura de 3,5 mm y una longitud de 60 mm (una longitud de 45 mm para la lámina porosa). Además, la fuerza para presionar sobre la hoja de la cortadora se ajustó para preparar también tiras con láminas porosas en donde las diferencias de altura (valores de protrusión) entre la porción central y la porción del borde fueran de

## ES 2 645 468 T3

0,01 mm, 0,03 mm, 0,05 mm y 0,07 mm, en lugar de los 0,10 mm descritos anteriormente.

[Método de procesamiento 6]

- 5 Se montó sobre la lámina porosa una capa absorbente Merck Millipore (20 mm x 300 mm) para cubrir aproximadamente 5 mm. Para fijar la capa absorbente, se pegó una cinta adhesiva (25 mm x 300 mm) a una placa de membrana. Posteriormente, cuando la lámina compuesta se procesó, la lámina porosa se presionó y se cortó mediante una cuchilla con un borde de hoja plana, no con un borde de hoja en ángulo agudo, utilizando una cortadora o una cuchilla de guillotina para cortar la lámina compuesta. Además, se aplicó un agente adhesivo al
- 10 borde de la hoja, para presionar y cortar la lámina de forma más fiable. Esto permitió obtener tiras con las láminas porosas con forma abombada, en que la porción central se proyecta con respecto a ambas porciones de los extremos en las láminas porosas, de forma que las diferencias de altura (valores de protrusión) entre la porción central y la porción del borde en las láminas porosas fueran de 0,01 mm, 0,03 mm, 0,05 mm, 0,07 mm y 0,10 mm. En este caso, a partir de una lámina compuesta se obtuvieron 85 tiras cada una con una anchura de 3,5 mm, una
- 15 longitud de 60 mm (una longitud de 45 mm para la lámina porosa).

(Ejemplo comparativo 2)

[Método de procesamiento 7]

- 20 Se montó sobre la lámina porosa una capa absorbente Merck Millipore (20 mm x 300 mm) para cubrir aproximadamente 5 mm. Para fijar la capa absorbente, se pegó una cinta adhesiva (25 mm x 300 mm) a una placa de membrana. El corte utilizando una hoja afilada con un borde en hoja afilada permitió obtener tiras de las herramientas de inspección para cromatografía de ácidos nucleicos de forma que el grosor de la lámina porosa era
- 25 uniforme (0,55 mm) y la diferencia de altura (valor de protrusión) entre la porción central y ambos lados de la lámina porosa era de 0,00 mm.

[Prueba de evaluación]

- 30 Las tiras de las herramientas de inspección para cromatografía de ácidos nucleicos de los Ejemplos 1 a 10 y los Ejemplos comparativos 1 y 2 se evaluaron utilizando un método de cromatografía en conformidad con los siguientes procedimientos 8 a 10.

[Procedimiento 8: Preparación de la fase móvil]

- 35 Se fijó una muestra de ADN (en este caso, modificada con un grupo amino) con la secuencia de bases complementaria a la secuencia de bases de la sonda número 1, a una partícula de látex carboxilado (con un color azul y un diámetro de partícula promedio de 400 nm). Las partículas de látex a las que estos ADN de muestra se fijaron se dispersaron en agua estéril como la fase móvil.
- 40

[Procedimiento 9: Proceso de expansión]

- 45 Se dispensaron 50 µl de la fase móvil a un microtubo de 0,2 ml. Después, el extremo distal de la tira de la herramienta de inspección para cromatografía de ácidos nucleicos se sumergió en la fase móvil. Inmediatamente después de la inmersión, la fase móvil se desplazó hacia arriba (en dirección hacia el otro extremo distal en donde la capa absorbente estaba dispuesta) en la lámina porosa mediante capilaridad. El azul de bromofenol (ABF) no se fijó a la lámina porosa y, por lo tanto, la fase móvil lo lavó. Este lavado elimina las líneas de azul de bromofenol [en las FIGS. 13(b) a 13(d) las líneas eliminadas se ilustran mediante asteriscos (\*)]. Por lo tanto, dado que la fase móvil se
- 50 desplaza hacia arriba, se eliminaron de forma secuencial nueve líneas de azul de bromofenol. Esto permitió comprobar de forma simple qué posición había alcanzado en la lámina porosa la fase móvil. En este caso, dado que la tinta magenta a base de pigmento del indicador de posición estaba fijada en la lámina porosa y era insoluble en la fase móvil, la fase móvil no lavó la tinta magenta a base de pigmento.

[Procedimiento 10: Proceso de detección]

- 55 Dado que el ADN de muestra de la fase móvil tiene la secuencia de bases complementaria a la sonda de ADN de captura de la sonda número 1, el ADN de muestra se une de forma específica a la sonda de ADN de captura de la sonda número 1 mediante una reacción de hibridación. Por consiguiente, la partícula de látex a la que está fijada el ADN de muestra se captura mediante la sonda de ADN de captura de la sonda número 1. En las porciones de
- 60 indicación a las que las sondas de ADN de captura de la sonda número 1 estaban fijadas, se acumularon, agregaron y después se colorearon de azul las partículas de látex [véase la FIG. 13(d)] en asociación con el progreso de la reacción de hibridación entre el ADN de muestra y la sonda de ADN de captura de la sonda número 1. Aproximadamente 20 minutos después de la inmersión en la fase móvil, toda la fase móvil se movió hacia la capa absorbente y después la reacción finalizó. Como se describe en el procedimiento 9 y el procedimiento 10 descritos
- 65 anteriormente, los colores de las líneas por azul de bromofenol (ABF) fueron eliminados en asociación con la expansión (elevación) de la fase móvil [con referencia a la FIG. 13(c)]. Después, la porción de indicación de la sonda

número 1 se coloreó (de azul) por la acumulación de las partículas de látex [con referencia a la FIG. 13(d)].

[Resultado de la prueba de evaluación]

- 5 Con respecto a las tiras de las herramientas de inspección para cromatografía de ácidos nucleicos de los Ejemplos 1 a 5 y el Ejemplo Comparativo 1, los resultados de la evaluación se muestran en la Tabla 2.

[Tabla 2]

	Valor de depresión (mm)	Manipulación	Color de la porción de indicación	Absorción de la fase móvil
Ejemplo 1	1,0	Buena	Excelente	Excelente
Ejemplo 2	2,0	Excelente	Excelente	Excelente
Ejemplo 3	3,0	Excelente	Excelente	Excelente
Ejemplo 4	4,0	Excelente	Excelente	Excelente
Ejemplo 5	5,0	Excelente	Buena	Buena
Ejemplo Comparativo 1	0,0	Errónea	Errónea	Excelente

10 (Manipulación)

Como se muestra en la Tabla 2, en el Ejemplo 1 en que el valor de depresión de la lámina porosa era de 1,0 mm, la manipulación tomó un poco de tiempo cuando la lámina se colocó sobre una mesa plana o se extrajo de la caja de embalaje [el resultado de la evaluación fue bueno, indicado como "Bueno" en la Tabla 2]. En los Ejemplos 2 a 5 en que el valor de depresión de la lámina porosa era de 2,0 a 5,0 mm, la manipulación fue realmente excelente [el resultado de la evaluación fue excelente, indicado como "Excelente" en la Tabla 2]. Por el contrario, en el Ejemplo Comparativo 1, en que el valor de depresión de la lámina porosa era de 0,00 mm, la manipulación fue difícil cuando la tira se colocó sobre una mesa plana o se extrajo de la caja de embalaje. Por consiguiente, en el Ejemplo Comparativo 1, se tocó con la mano la región en donde las sondas de ADN de captura se aplicaron de forma puntual o en algunos casos la tira se deformó [el resultado de evaluación fue malo, indicado como "Erróneo" en la Tabla 2].

(Color de la porción de indicación)

Con respecto al color de la porción de indicación en donde se fijó la sonda de ADN de captura de la sonda número 1, en los Ejemplos 1 a 4 en que el valor de depresión de la lámina porosa era de 1,0 a 4,0 mm, se observó que el color de la porción de indicación era considerablemente intenso (más intenso que el del nivel habitual) dado que el valor de depresión aumentó [el resultado de evaluación fue excelente, indicado como "Excelente" en la Tabla 2]. En la tira de la herramienta de inspección para cromatografía de ácidos nucleicos del Ejemplo 5, en ocasiones fue imposible expandir la cantidad total de la fase móvil (descrito con detalle a continuación). En este caso, el color de la porción de indicación fue intenso, con un nivel habitual [el resultado de la evaluación fue bueno, indicado como "Bueno" en la Tabla 2]. En este caso, en el Ejemplo Comparativo 1, en que el valor de depresión de la lámina porosa era de 0,0 mm, el color de la porción de indicación fue fino y borroso [el resultado de evaluación fue malo, indicado como "Erróneo" en la Tabla 2].

35 (Absorción de la fase móvil)

En las tiras de las herramientas de inspección para cromatografía de ácidos nucleicos de los Ejemplos 1 a 4 y el Ejemplo Comparativo 1, fue posible mover la cantidad total de la fase móvil en el microtubo hasta la capa absorbente [el resultado de la evaluación fue excelente, indicado como "Excelente" en la Tabla 2]. En la tira de la herramienta de inspección para cromatografía de ácidos nucleicos del Ejemplo 5, en ocasiones fue imposible mover aproximadamente la cantidad total de la fase móvil hasta la capa absorbente, dado que la capa absorbente estaba parcialmente delaminada y se produjo un hueco entre la lámina porosa y la lámina absorbente [el resultado de evaluación fue bueno, indicado como "Bueno" en la Tabla 2].

45 Por lo tanto, en las tiras de las herramientas de inspección para cromatografía de ácidos nucleicos de los Ejemplos 1 a 5, se encontró que eran preferentes todos los puntos de "manipulación", "color de la porción de indicación" y "absorción de la fase móvil" (tuvieron resultado de la evaluación "bueno" o un resultado mejor).

50 Con respecto a las tiras de las herramientas de inspección para cromatografía de ácidos nucleicos de los Ejemplos 6 a 10 y el Ejemplo Comparativo 2, los resultados de la evaluación se muestran en la Tabla 3.



[Tabla 3]

	Valor de protrusión (mm)	Visibilidad desde el lateral	Facilidad de determinación del color de la porción de indicación desde el lateral
Ejemplo 6	0,01	Bueno	Bueno
Ejemplo 7	0,03	Excelente	Bueno
Ejemplo 8	0,05	Excelente	Bueno
Ejemplo 9	0,07	Excelente	Excelente
Ejemplo 10	0,10	Excelente	Excelente
Ejemplo Comparativo 2	0,00	Erróneo	Erróneo

(Visibilidad desde el lateral)

5 Como se muestra en la Tabla 3, en el caso en que la diferencia en altura (valor de protrusión) entre la porción central y las porciones del extremo en la lámina porosa era de 0,01 mm, como en el Ejemplo 6, apenas fue posible ver la línea del indicador de posición desde el lateral de la tira de la herramienta de inspección para cromatografía de ácidos nucleicos [el resultado de la evaluación fue bueno, indicado como "Bueno" en la Tabla 3]. Además, en el caso en que la diferencia de altura (valor de protrusión) entre la porción central y la porción del extremo de la lámina porosa era de 0,03 a 0,10 mm, como en los Ejemplos 7 a 10, fue posible ver de forma nítida la línea del indicador de posición [el resultado de la evaluación fue excelente, indicado como "Excelente" en la Tabla 3]. De forma adicional, en el caso en que la diferencia de altura (valor de protrusión) entre la porción central y las porciones de los extremos en la lámina porosa era de 0,03 a 0,10 mm, como en los Ejemplos 7 a 10, se encontró que la visibilidad de la línea del indicador de posición aumentó dado que la diferencia en altura entre la porción central y las porciones finales en la lámina porosa aumentó. Por el contrario, en el caso en donde la diferencia de altura (valor de protrusión) entre la porción central y las porciones de los extremos de la lámina porosa era del 0,00 mm, como en el Ejemplo Comparativo 2, fue imposible ver la línea del indicador de posición desde el lateral de la tira de la herramienta de inspección para cromatografía de ácidos nucleicos [el resultado de la evaluación fue malo, indicado como "Erróneo" en la Tabla 3].

20

(Facilidad de determinación del color de la porción de indicación desde el lateral)

25 En el caso en que la diferencia de altura (valor de protrusión) (diferencia de grosor) entre la porción central y las porciones de los extremos en la lámina porosa era de 0,01 a 0,05 mm, como en los Ejemplos 6 a 8, fue posible comprobar el color de la porción de indicación desde el lateral de la tira de la herramienta de inspección para cromatografía de ácidos nucleicos [el resultado de la evaluación fue bueno, indicado como "Bueno" en la Tabla 3]. Además, en el caso en que la diferencia de altura (valor de protrusión) (diferencia en grosor) entre la porción central y las porciones de los extremos en la lámina porosa era de 0,07 a 0,10 mm, como en los Ejemplos 9 y 10, fue posible comprobar de forma muy nítida el color de la porción de indicación desde el lateral de la tira de la herramienta de inspección para cromatografía de ácidos nucleicos [el resultado de la evaluación fue excelente, indicado como "Excelente" en la Tabla 3]. Por el contrario, cuando la diferencia de altura (valor de protrusión) (diferencia de grosor) entre la porción central y las porciones de los extremos en la lámina porosa fue de 0,00 mm, como el Ejemplo Comparativo 2, fue imposible comprobar el color de la porción de indicación desde el lateral de la tira de la herramienta de inspección para cromatografía de ácidos nucleicos [el resultado de la evaluación fue malo, indicado como "Erróneo" en la Tabla 3].

35

40 En este caso, se tomaron en consideración los resultados de la observación al microscopio y similar, para las superficies de la lámina porosa en las tiras de las herramientas de inspección para cromatografía de ácidos nucleicos en los Ejemplos 6 a 10 y el Ejemplo Comparativo 2. Se encontró que cuando se utilizó como el material una placa de membrana (lámina porosa) en que el grosor original era uniforme, y la lámina porosa se procesó de forma que la porción central era gruesa y ambas porciones del extremo eran finas en la lámina como un producto acabado, la región cerca de ambas porciones del borde de la lámina porosa en la tira se contrajeron en el producto acabado. Por consiguiente, se encontró que el diámetro de apertura promedio de la lámina porosa disminuyó en la superficie de esta región cerca de ambas porciones del extremo y la densidad de la sonda de ADN aumentó en asociación con esta disminución del diámetro de apertura promedio. Con este sistema fue posible concluir que el color se hizo considerablemente más nítido en la región cerca de ambas porciones del extremo de la lámina porosa en las tiras de las herramientas de inspección para cromatografía de ácidos nucleicos de los Ejemplos 9 y 10.

45

### Aplicabilidad industrial

50

La presente invención está disponible para una herramienta de inspección para cromatografía de ácidos nucleicos que se puede utilizar para un diagnóstico relacionado con una infección, una alergia y similar, y para la detección de una bacteria, un virus y similar.

**Descripción de los números de referencia**

1, 1a, y 1b: herramienta de inspección para cromatografía de ácidos nucleicos, 10: lámina porosa, 13: superficie de detección, 14a a 14c: indicador de posición, 15 y 15a a 15e: porciones de indicación, 18a y 18b: porción del extremo (de la porción de indicación), 20: elemento de refuerzo, 25: superficie unida, 27: superficie posterior, 40: capa absorbente, 45: porción del extremo distal, 50: tubo de ensayo, 55: muestra de ensayo, 60: ácido nucleico diana, 65: colorante, 70: caja de embalaje, 73: pared interna, 75: conjunto de herramientas de inspección para cromatografía de ácidos nucleicos, 101, 101a y 101b: herramienta de inspección para cromatografía de ácidos nucleicos, 110: lámina porosa, 113: superficie de detección, 114a a 114c: indicador de posición, 115 y 15a a 15e: porción de indicación, 118a a 118d: porción del extremo (de la porción de indicación), 120: elemento de refuerzo, 125: superficie unida, 140: capa absorbente, 145: porción del extremo distal, 150: tubo de ensayo, 155: muestra de ensayo.

**LISTADO DE SECUENCIAS**

15 <110> NGK INSULATORS, LTD.  
 <120> Herramienta de inspección para cromatografía de ácidos nucleicos

20 <130> MJN/FP7096423  
 <140> 13813719.5  
 <141> 05-07-2013

25 <150> PCT/JP2013/068565  
 <151> 05-07-2013  
 <150> JP2012-153114  
 <151> 06-07-2012

30 <160> 9  
 <170> PatentIn versión 3.5

35 <210> 1  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Secuencia artificial

45 <400> 1  
 tgttctctga ccaatgaatc tgc 23

50 <210> 2  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

55 <220>  
 <223> Secuencia artificial

60 <400> 2  
 tggaactggg aacgcttag atg 23

65 <210> 3  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Secuencia artificial

65 <400> 3  
 ttcgcttcgt tgtaattcg gac 23

ES 2 645 468 T3

	<210> 4	
	<211> 23	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia artificial	
10	<400> 4 aggcatccta agaatcgct act	23
	<210> 5	
	<211> 23	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia artificial	
20	<400> 5 tagcccagtg atttatgaca tgc	23
	<210> 6	
25	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
30	<223> Secuencia artificial	
	<400> 6 agggccgta gtaatttagg tgc	23
	<210> 7	
35	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
40	<223> Secuencia artificial	
	<400> 7 tattctacca acgacatcac tgc	23
45	<210> 8	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Secuencia artificial	
	<400> 8 catctccaag aattgacca cca	23
55	<210> 9	
	<211> 23	
	<212> ADN	
60	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia artificial	
65	<400> 9 gaaggatcgc tttatctgg cat	23

**REIVINDICACIONES**

1. Una herramienta de inspección para cromatografía de ácidos nucleicos, que comprende:

5 una lámina porosa alargada que expande un líquido de muestra que contiene un ácido nucleico diana y detecta el ácido nucleico diana de manera que se indica la detección; y  
un elemento de refuerzo donde está unida la lámina porosa, en el que  
la lámina porosa tiene una superficie que incluye una superficie de detección, incluyendo la superficie de  
detección una porción de indicación con forma de tira en donde está fijada una sonda de ácido nucleico para la  
10 captura del ácido nucleico diana, extendiéndose la porción de indicación a un ángulo para intersecarse con una  
dirección longitudinal de la lámina porosa,

en la que se aplica (i) o (ii):

15 (i) el elemento de refuerzo tiene una superficie unida en donde está unida la lámina porosa, la superficie unida  
tiene una forma cóncava y la lámina porosa tiene una forma combada que sigue la forma cóncava de la  
superficie unida;

o  
20 (ii) en una sección transversal de la porción de indicación tomada de forma perpendicular a la superficie de  
detección y a lo largo de una dirección de extensión de la porción de indicación, una porción distinta de ambas  
porciones de los extremos de la porción de indicación sobresale con respecto a una línea de referencia que  
acopla ambas porciones de los extremos de la porción de indicación.

2. La herramienta de inspección para cromatografía de ácidos nucleicos de acuerdo con la reivindicación 1, en la  
25 que se aplica (i) y:

la superficie unida tiene una forma cóncava en una sección transversal que es paralela a la dirección longitudinal  
de la lámina porosa y paralela a una dirección de grosor de la lámina porosa.

3. La herramienta de inspección para cromatografía de ácidos nucleicos de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2,  
30 en la que se aplica (i) y:

la superficie de detección tiene un diámetro de apertura promedio más pequeño que un diámetro de apertura  
promedio en una superficie en el lado de la superficie unida de la lámina porosa en asociación con la  
35 deformación de la lámina porosa.

4. La herramienta de inspección para cromatografía de ácidos nucleicos de acuerdo con una cualquiera de las  
reivindicaciones 1 a 3, en la que se aplica (i) y:

40 el elemento de refuerzo es una placa alargada y una dirección longitudinal del elemento de refuerzo es paralela a  
la dirección longitudinal de la lámina porosa.

5. La herramienta de inspección para cromatografía de ácidos nucleicos de acuerdo con una cualquiera de las  
reivindicaciones 1 a 4, en la que se aplica (i) y:

45 la lámina porosa está combada con una curvatura.

6. La herramienta de inspección para cromatografía de ácidos nucleicos de acuerdo con la reivindicación 5, en la  
que se aplica (i) y:

50 la lámina porosa tiene un valor de depresión de 1,0 a 5,0 mm.

7. La herramienta de inspección para cromatografía de ácidos nucleicos de acuerdo con una cualquiera de las  
reivindicaciones 1 a 6, en la que se aplica (i) y:

55 el elemento de refuerzo tiene una superficie en un lado opuesto de la superficie unida en una forma protuberante  
complementaria a la forma cóncava de la superficie unida, de manera que está arqueado.

8. Un conjunto de herramientas de inspección para cromatografía de ácidos nucleicos, que comprende:

60 una pluralidad de las herramientas de inspección para cromatografía de ácidos nucleicos de acuerdo con una  
cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en las que se aplica (i); y  
una caja de embalaje que aloja la herramienta de inspección para cromatografía de ácidos nucleicos.

65 9. Un conjunto de herramientas de inspección para cromatografía de ácidos nucleicos, que comprende:

- una pluralidad de las herramientas de inspección para cromatografía de ácidos nucleicos de acuerdo con la reivindicación 7, en las que se aplica (i); y  
una caja de embalaje que aloja la herramienta de inspección para cromatografía de ácidos nucleicos, en la que los respectivos elementos de refuerzo de la pluralidad de las herramientas de inspección para cromatografía de ácidos nucleicos están arqueados con distintas curvaturas.
- 5
10. La herramienta de inspección para cromatografía de ácidos nucleicos de acuerdo con la reivindicación 1, en la que se aplica (ii) y:
- 10 en la sección transversal perpendicular a la dirección longitudinal de la lámina porosa, la superficie de detección sobresale mientras presenta una curvatura.
11. La herramienta de inspección para cromatografía de ácidos nucleicos de acuerdo con la reivindicación 1, en la que se aplica (ii), o de acuerdo con la reivindicación 11, en la que
- 15 en la porción de indicación, la sonda de ácido nucleico está fijada a una densidad más alta en una región que tiene una anchura predeterminada desde cada una de ambas porciones de los extremos de la porción de indicación hacia un centro, en comparación con una región residual en la misma porción de indicación.
12. La herramienta de inspección para cromatografía de ácidos nucleicos de acuerdo con la reivindicación 1, en la que se aplica (ii), o de acuerdo con la reivindicación 10 o la reivindicación 11, en la que
- 20 en la porción de indicación, la lámina porosa tiene un diámetro de apertura promedio más pequeño en una región que tiene una anchura predeterminada desde cada una de ambas porciones de los extremos de la porción de indicación hacia un centro, en comparación con una región residual en la misma porción de indicación.

FIG.1A

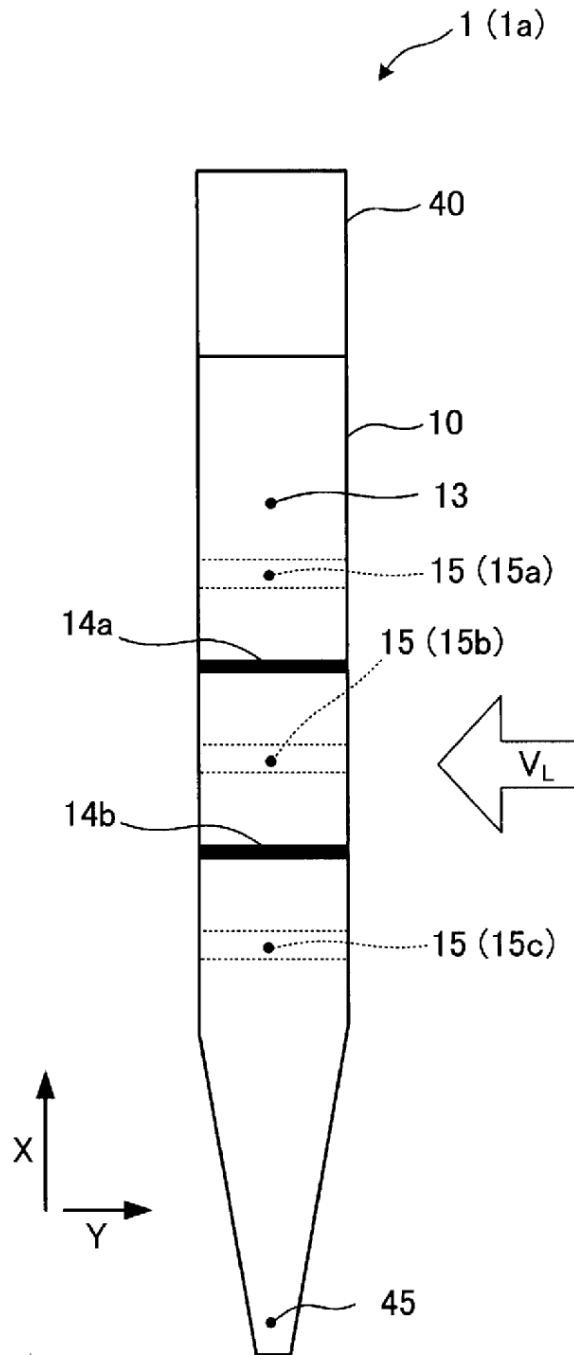


FIG.1B

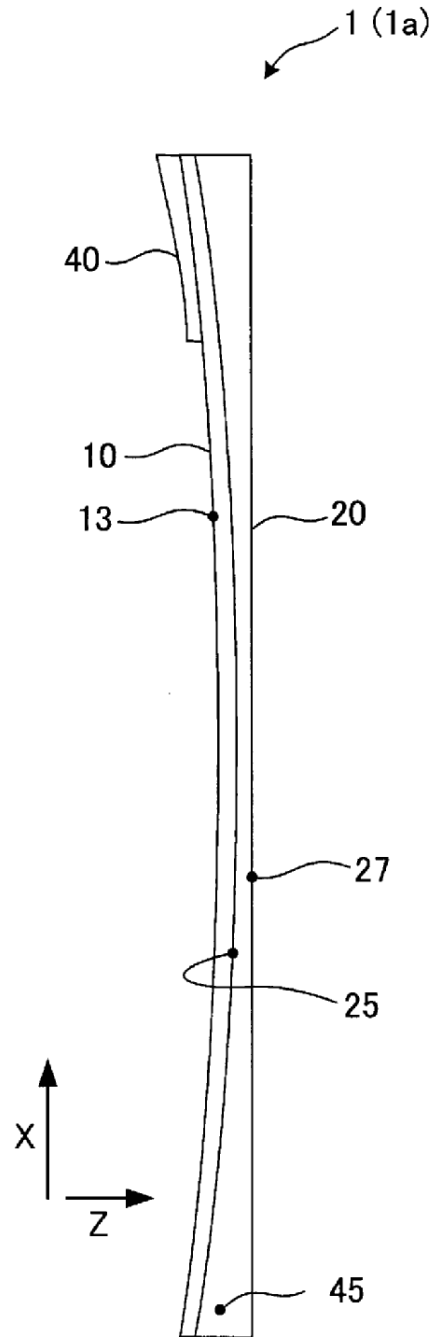


FIG.2

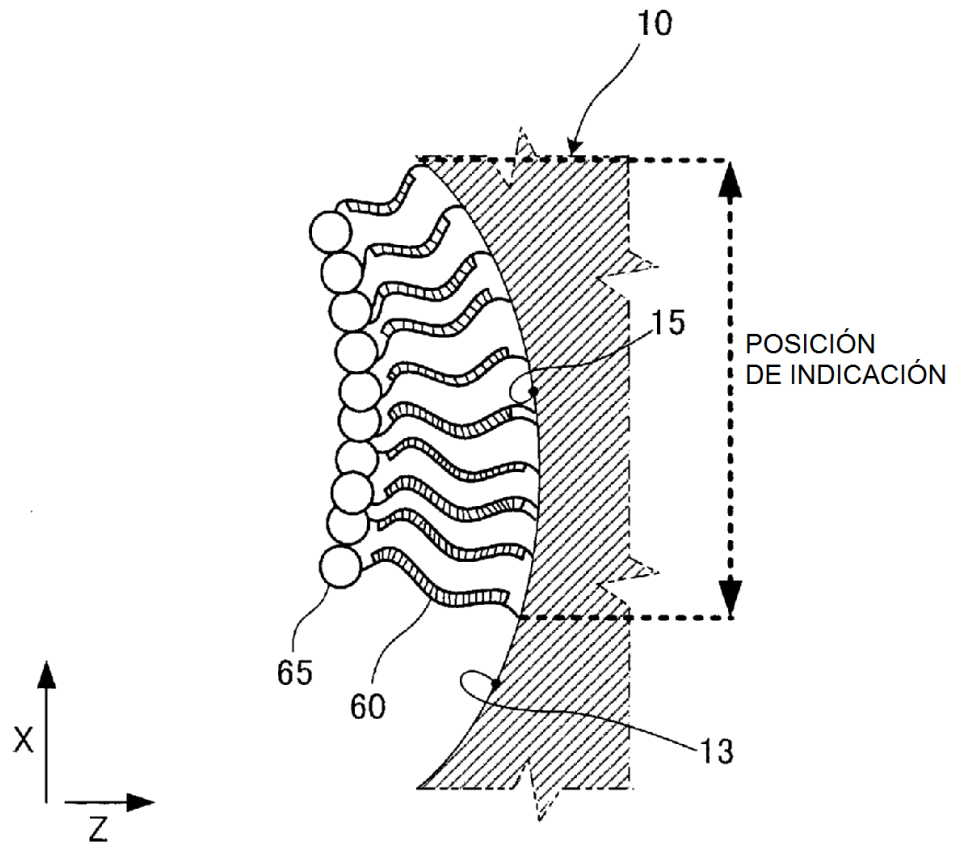




FIG.3

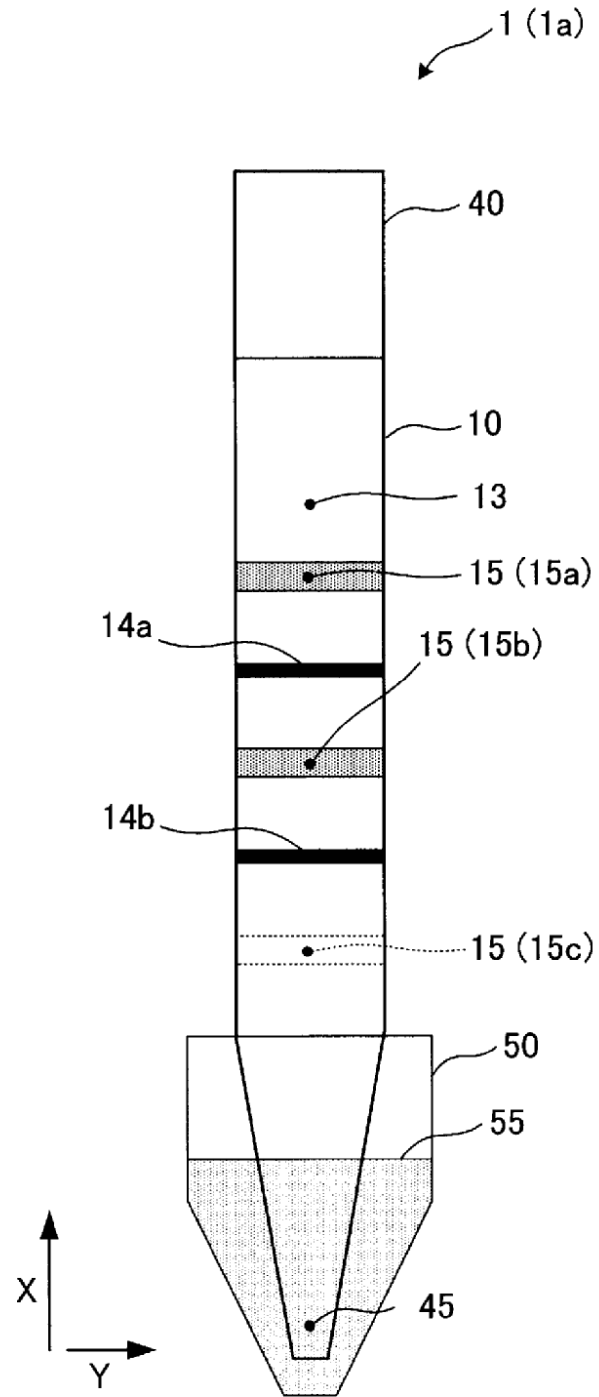


FIG.4

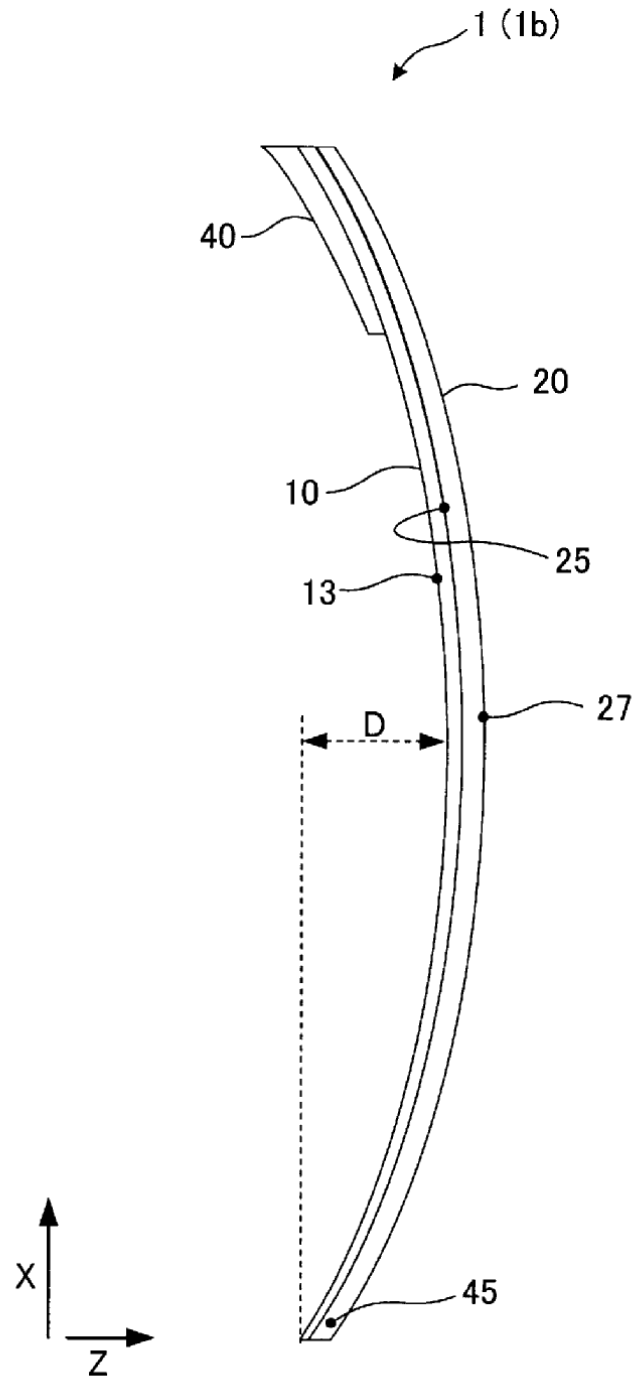


FIG.5

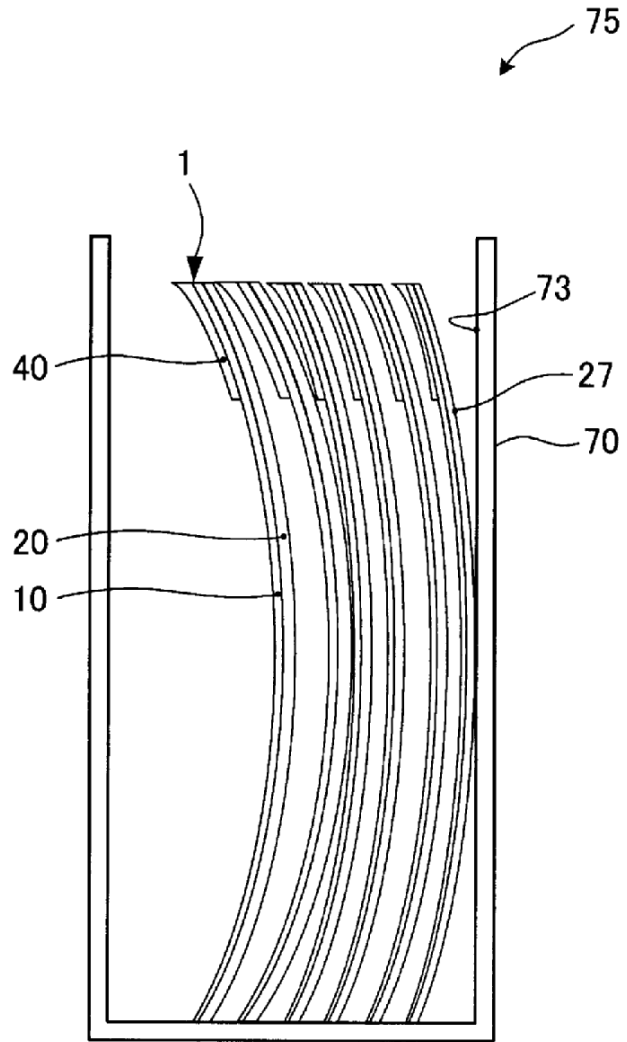


FIG.6A

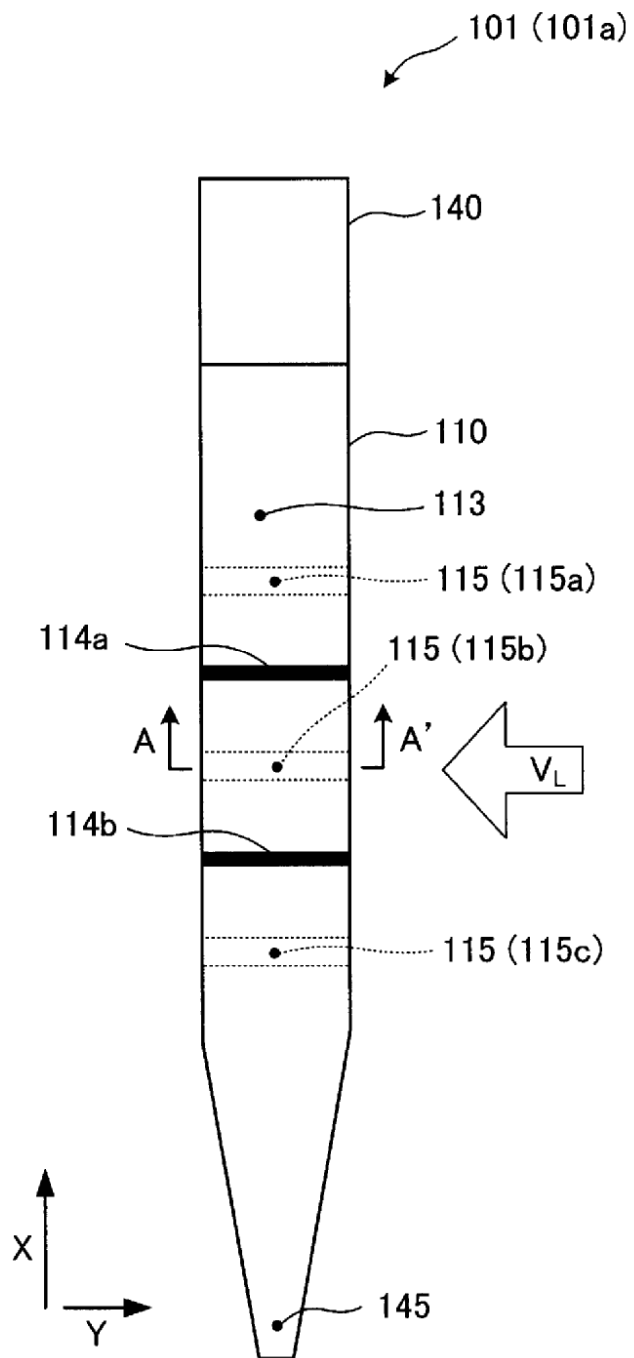


FIG.6B

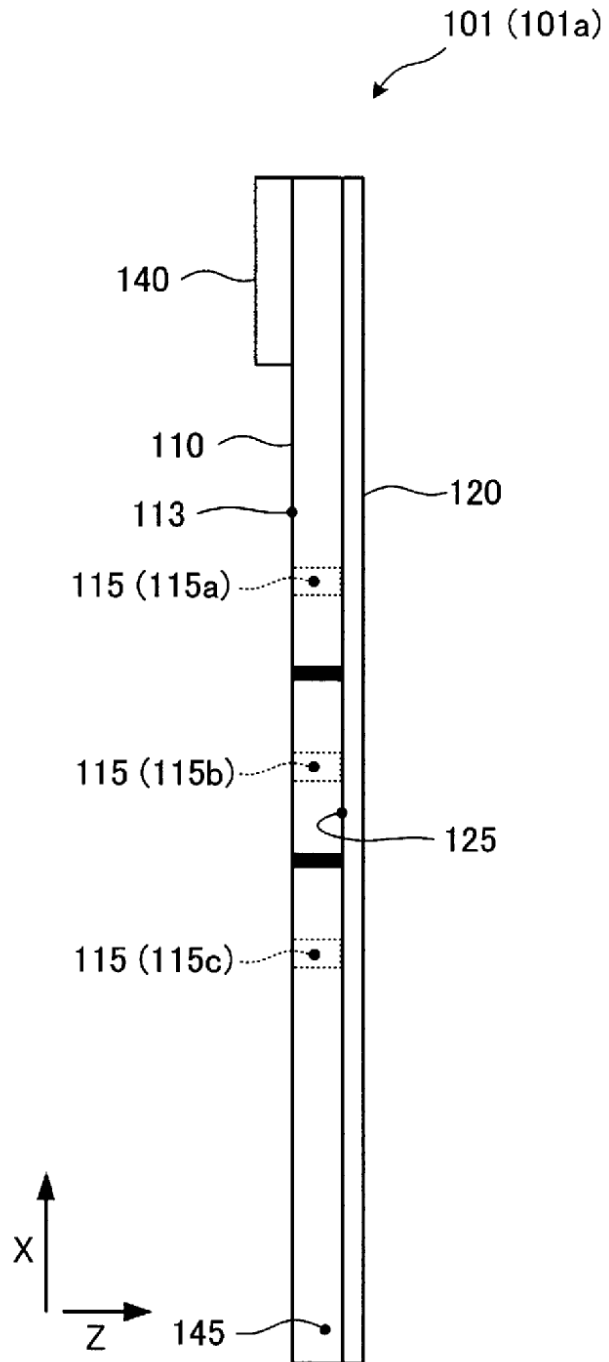


FIG.7

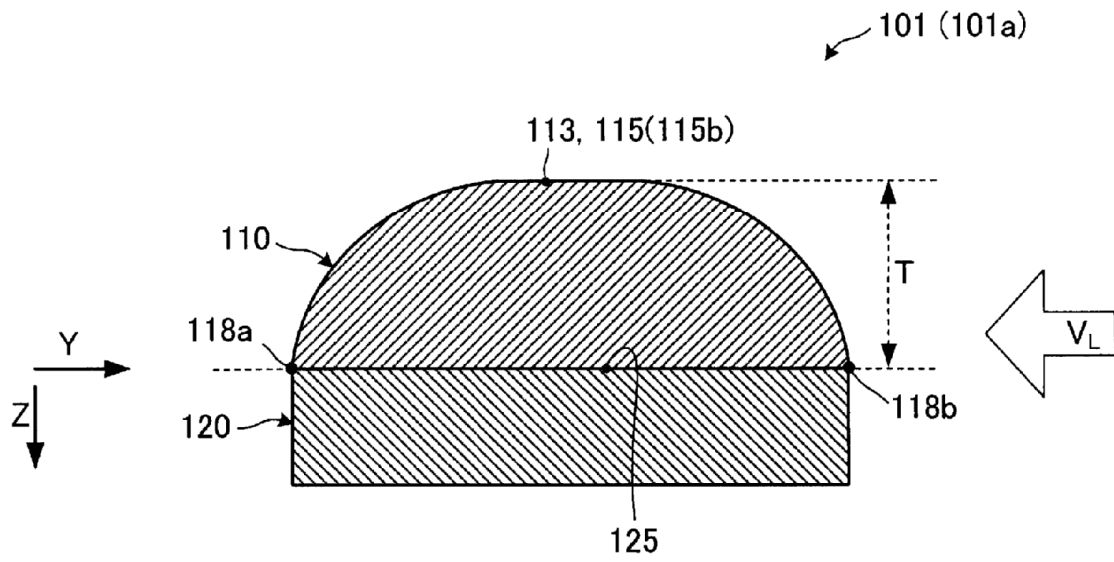


FIG.8A

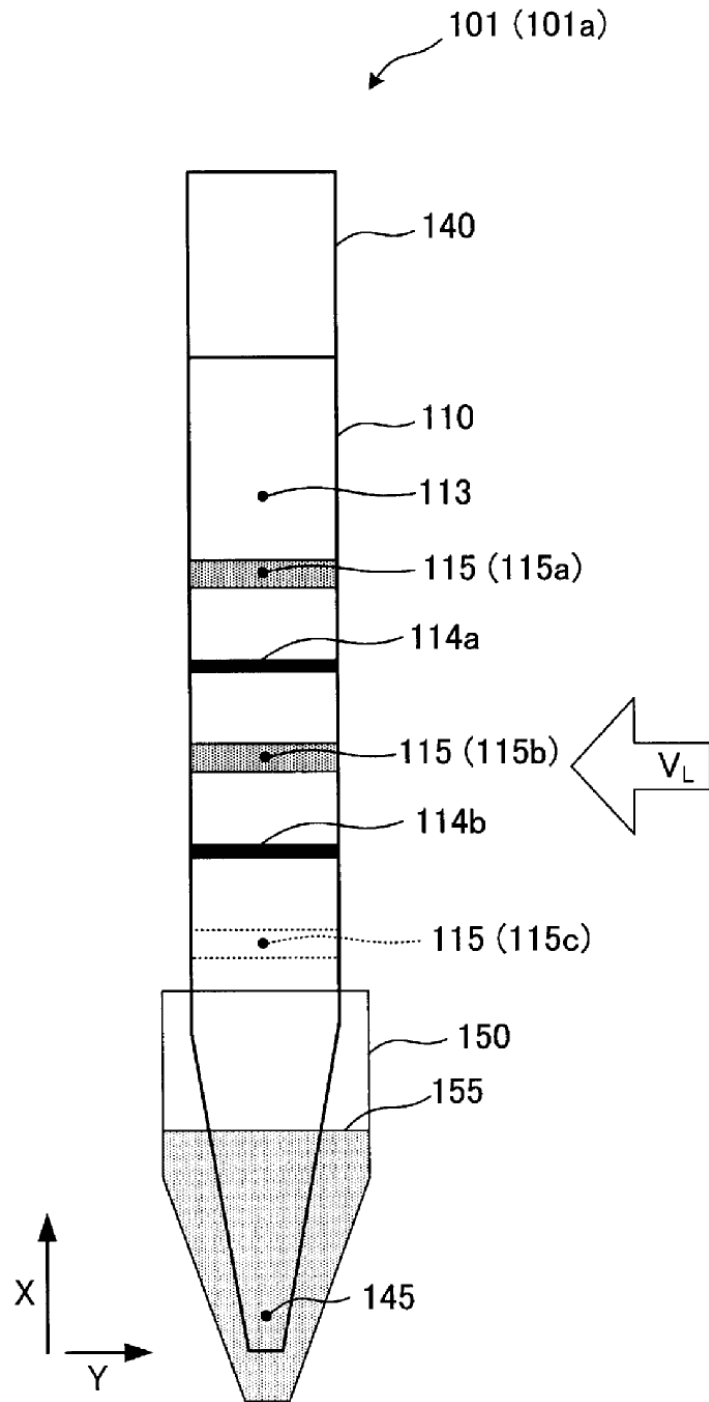


FIG.8B

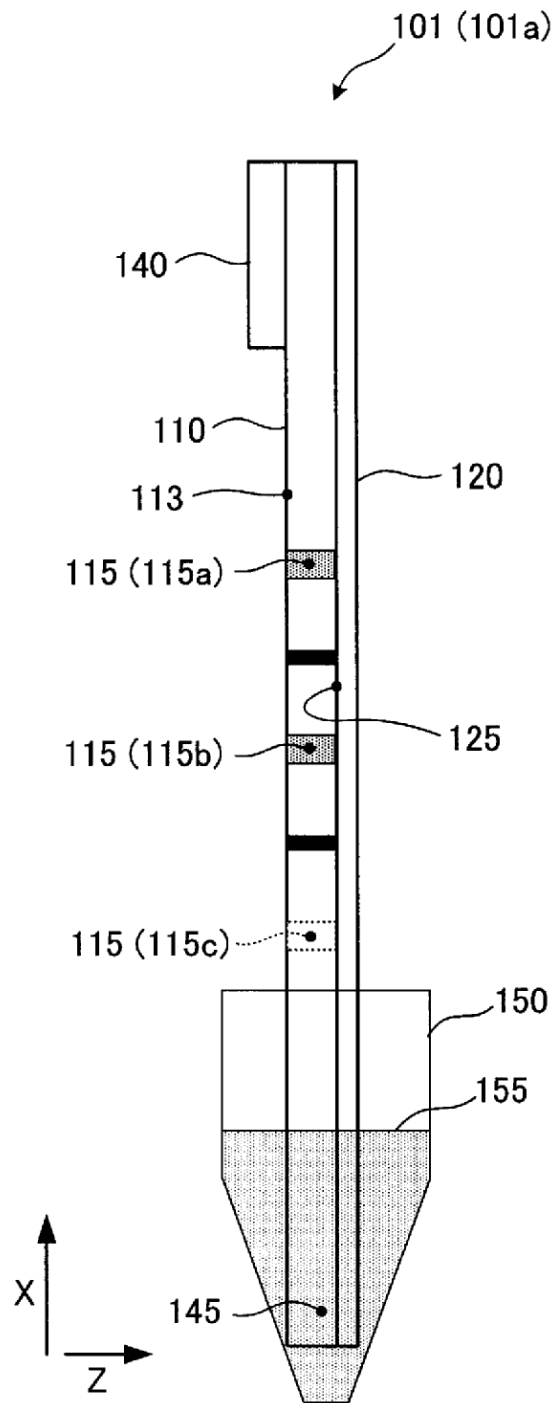




FIG.9

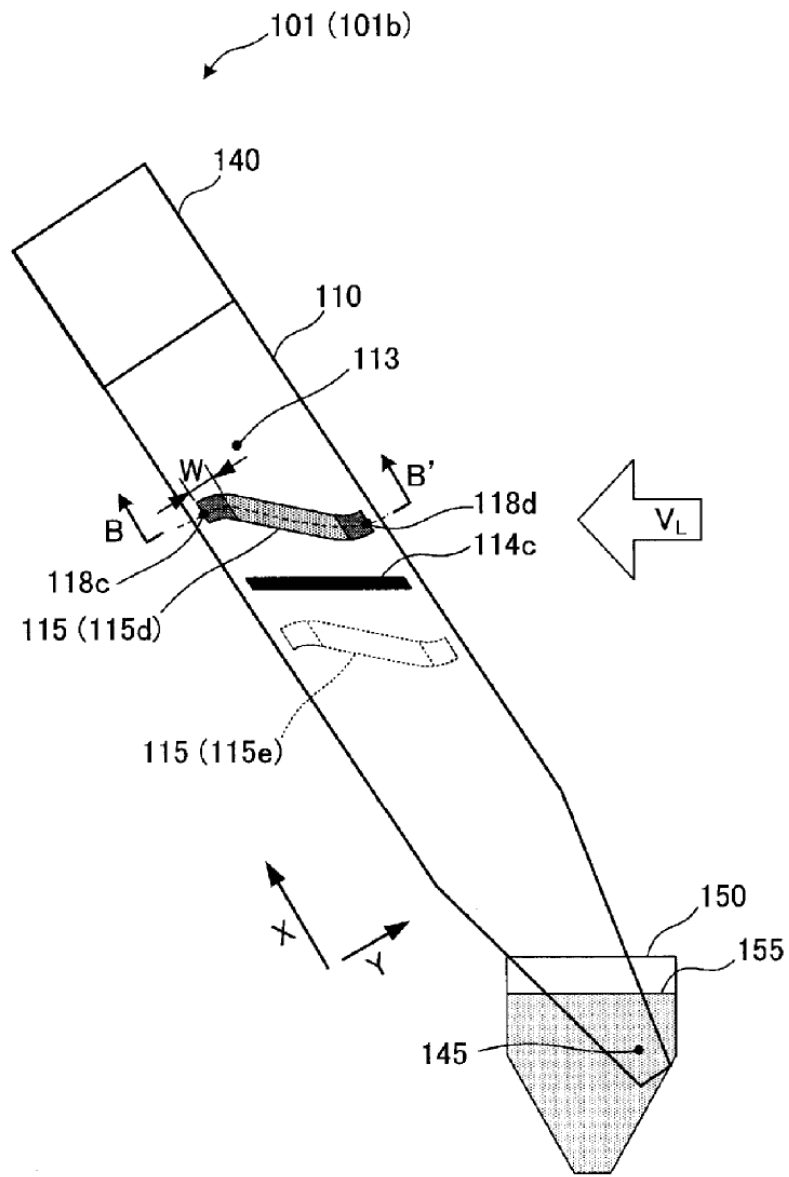


FIG.10

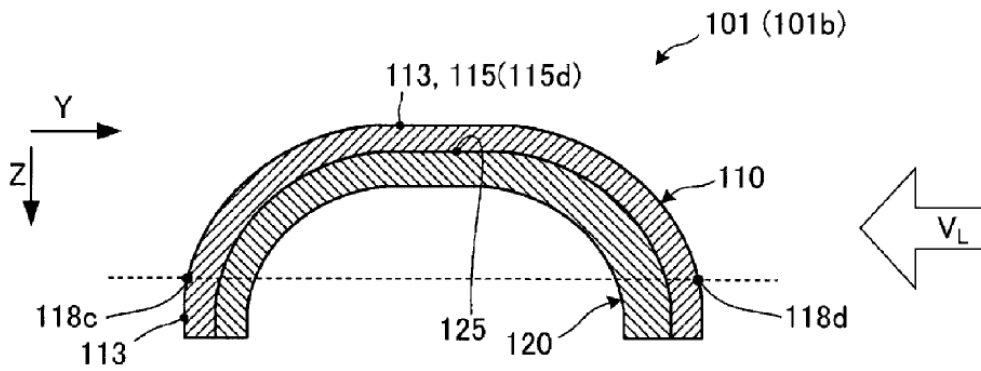


FIG.11

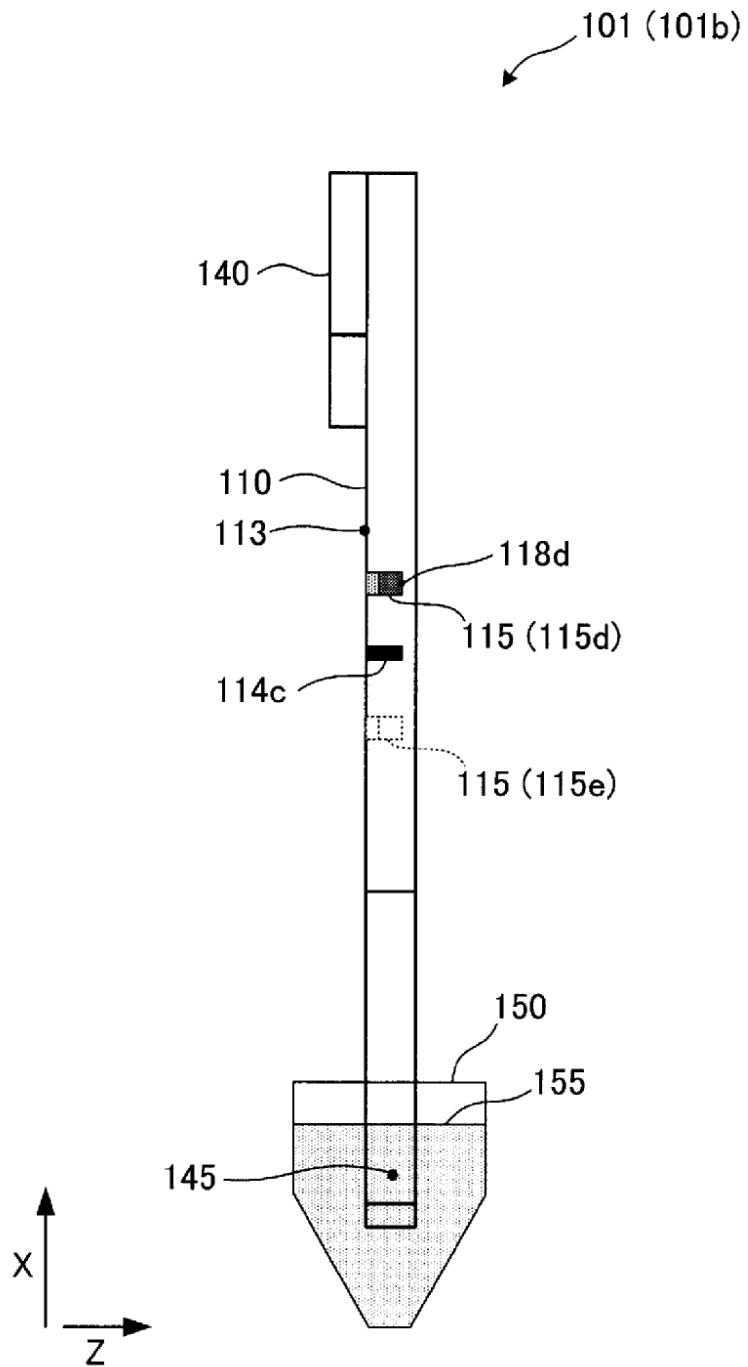


FIG.12

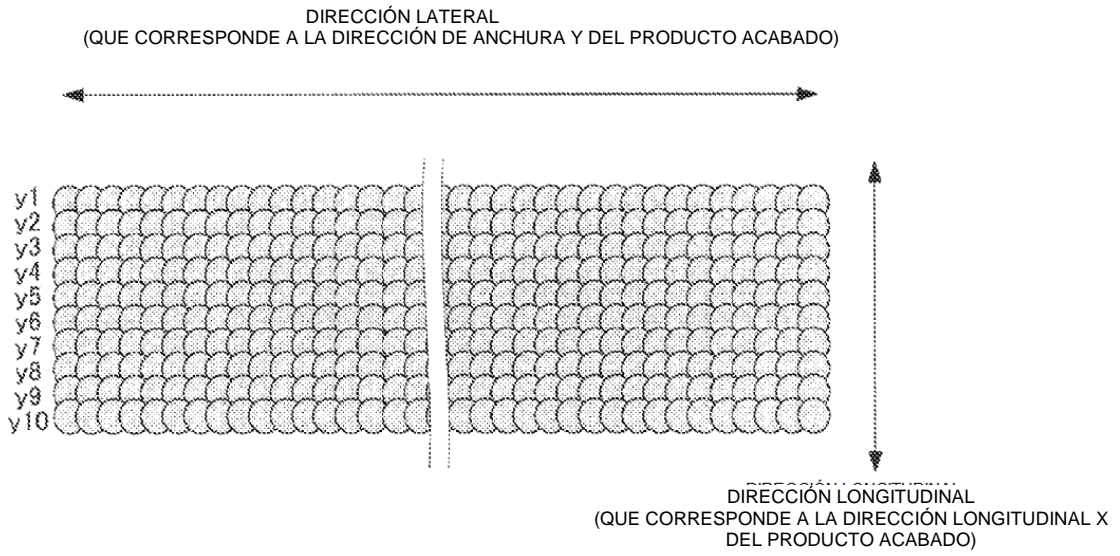


FIG.13

