



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 100389

(13) C2

(51) МПК

G01N 33/48 (2006.01)

G01N 33/487 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки:	а 2010 04269	(72) Винахідник(и):	Кумар Кішоре Крішна (IN), Джаяраман Равіпракаш (IN), Нарасімха Санкарананд Кайра (IN), Раднакрішнан Ренджіх Махіладеві (IN), Вісванатхан Сахиадіп (IN), Наір Чандрасекхар Бхаскаран (IN), Суббарао Пілларісетті Венката (IN), Джаганнах Мандула (IN), Ченнакрішнаіах Шілпа (IN)
(22) Дата подання заявки:	13.10.2008	(73) Власник(и):	БІГТЕК ПРАЙВЕТ ЛІМІТЕД, II Floor, SID Entrepreneurship Building, IISC Campus, Malleshwaram, Bangalore 560 012, Karnataka, India (IN)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід:	25.12.2012	(74) Представник:	Рогуля Ольга Петрівна, реєстр. №233
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	02312/CHE/2007, 02313/CHE/2007, 02314/CHE/2007, 02311/CHE/2007, 02328/CHE/2007	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	D. J. Sadler, R. Changrani, P. Roberts, C.F. Chou, F. Zenhausern "Thermal management of ioMEMS: Temperature control for ceramic- based PCR and DNA detection device", IEEE Transactions on components and packaging technologies, Vol. 26, No2, ISSN 1521-3331; June 2003 Golonka L.J., Roguszczyk H., Zawada T., Radojewski J., Grabowska I., Chudy M., Dybko A., Brzozka Z., Stadnik D. "LTCC based microfluidic system with optical detection" Sensors and Actuators B: Chemical, Vol 111-112, ISSN 0925-4005; November 2005 Cynthia S. Mart?nez-Cisnerosb, N?ria Ib??ez- Garc?aa, Francisco Vald?sb, Juli?n Alonso "LTCCmicroflowanalyzers with monolithicintegration of thermal control", Sensors and Actuators A: Physical, Vol 138, No1, ISSN 0924-4247; July 2007
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	12.10.2007, 12.10.2007, 12.10.2007, 12.10.2007, 15.10.2007		
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	IN, IN, IN, IN, IN		
(41) Публікація відомостей про заявку:	12.09.2011, Бюл.№ 17		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	25.12.2012, Бюл.№ 24		
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	PCT/IN2008/000666, 13.10.2008		

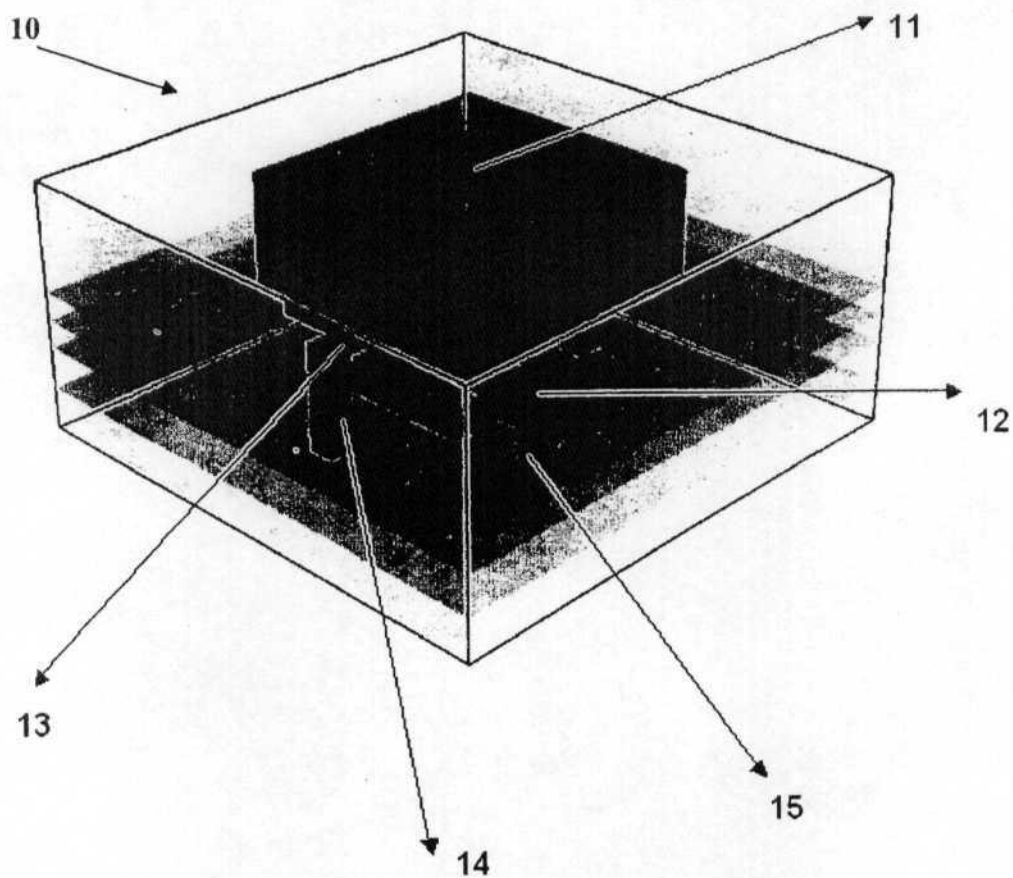
(54) МІКРОСХЕМА

(57) Реферат:

У описі поточного винаходу мова йдеться про мікросхему, яка складається з великої кількості шарів низькотемпературної кераміки, в межах якої реакційна камера формується в множині верхніх шарів для завантаження зразків. Підігрівач вмонтовано принаймні в один з шарів, розташованого нижче реакційної камери, а температурний датчик вмонтовано принаймні в один з шарів між підігрівачем і реакційною камерою для проведення аналізу зразка. Температурний

UA 100389 C2

датчик може розміщуватися з зовнішнього боку мікросхеми для вимірювання температури мікросхеми.



Фіг. 1

Область техніки, до якої належить винахід

Це розкриття стосується мікросхеми для ПЛР (Полімеразної Ланцюгової Реакції), яка складається з великої кількості шарів, виготовлених з низькотемпературної кераміки. Це розкриття також передбачає можливість використання портативного пристрою для проведення

5 ПЛР в режимі реального часу з одноразовою мікросхемою ПЛР, виготовленою з низькотемпературної кераміки.

Передумови створення винаходу

Останні досягнення в молекулярній та клітинній біології було зроблено внаслідок розвитку стрімких і ефективних аналітичних технік. Завдяки мініатюризації та мультиплексуванню такі

10 техніки, як генний чип чи біочип, дають можливість охарактеризувати всі геноми в одній експериментальній установці. ПЛР (Полімеразна ланцюгова реакція) – це метод молекулярної біології для збільшення молекул ядерної кислоти in-vivo (в організмі). Техніка ПЛР стрімко витісняє інші тривалі в часі та менш точні техніки, які використовуються для ідентифікації біологічних видів і патогенних мікроорганізмів в зразках криміналістичного матеріал, зразках,

15 взятих з оточуючого середовища, клінічних та промислових зразках. Серед біотехнологій техніка ПЛР стала найголовнішим аналітичним кроком в лабораторіях природничих наук для великої кількості випадків молекулярної та клінічної діагностики. Важливі розробки, зроблені в сфері технології ПЛР такі, як проведення ПЛР в режимі реального часу, призвели до процесів стрімкого протікання реакцій в порівнянні з традиційними методами. Впродовж декількох

20 останніх років технологія мікрообробки розширилась до процесу мініатюризації системи хімічного реагування та аналізу, такої як аналіз ПЛР з метою подальшого скорочення часу, необхідного для аналізу, та зменшення об'єму реагентів, що використовуються. Декілька дослідницьких груп працювали на пристроях типу "лабораторія-на-мікросхемі" і зробили ряд досягнень в сфері мініатюрних систем розщеплення та реагування.

У більшості ПЛР, наявних на сьогодні, неможливі миттєві температурні зміни, з причин теплоємності зразка, контейнера, датчика циклів, а також тривалого часу ампліфікації, що становить від 2 до 6 годин. Протягом проміжків часу, коли відбувається перехід температури зразка від однієї до іншої, трапляються зовнішні небажані реакції, під час яких споживаються

важливі реагенти, і створюються небажані інтерферуючі суміші.

Цілі винаходу

Метою цього винаходу було створення мікросхеми, яка б дозволила прискорити виконання ПЛР.

Ще одна ціль цього винаходу полягала в створенні удосконаленої мікросхеми.

Однією з основних цілей цього винаходу є розробка мікросхеми, яка складається з великої

кількості шарів низькотемпературної кераміки.

Ще однією ціллю поточного винаходу є розробка методу виготовлення мікросхеми.

Ще однією ціллю поточного винаходу є розробка мікропристрою для проведення ПЛР, який

складається з мікросхеми.

Ще однією ціллю цього винаходу є розробка методу діагностування хворобливих станів, використовуючи мікропристрій ПЛР.

Викладення суті винаходу

Цей винахід відповідно представляє мікросхему, яка складається з великої кількості шарів з низькотемпературної кераміки, в межах якої реакційна камера формується в численні шари реакційної камери для завантаження зразка, провідник вмонтовується, принаймні, в один шар провідника, який розміщується нижче реакційної камери, а підігрівач вбудовано, принаймні, в один нагрівальний шар, що розміщується нижче провідникового шару(шарів); метод виготовлення мікросхеми складається з таких етапів: (а) розташування в певному порядку

45 множини шарів з низькотемпературної кераміки та передбачення комірки для формування реакційної камери, (b) розміщення, принаймні, одного шару з низькотемпературної кераміки, що має підігрівач нижче цієї камери, (c) розміщення одного чи декількох провідникових шарів між підігрівачем та реакційною камерою; й (d) поєднання шарів для формування мікросхеми; мікропристрій ПЛР складається з: (а) мікросхема, яка складається з великої кількості шарів з низькотемпературної кераміки, в межах якої реакційна камера формується в численні шари реакційної камери для завантаження зразка, провідник вмонтовується, принаймні, в один шар, який розміщується нижче реакційної камери, а підігрівач вбудовано, принаймні, в один шар, що

50 розміщується нижче провідникового шару(шарів); (b) температурний датчик вбудовано в мікросхему чи розміщено з зовнішнього боку цієї мікросхеми для вимірювання температури мікросхеми, (c) схема управління для управління роботою підігрівача на підставі значення вхідного сигналу температурного датчика; та (d) оптична система для виявлення флуоресцентного сигналу зі зразка; та методу виявлення в зразку аналіту, речовини, наявності

якої визначається аналізом, або ж діагностування хворобливого стану, використовуючи мікропристрій ПЛР, цей метод має такі етапи: (а) завантаження зразку, що складається з ядерної кислоти, в мікросхему, яка складається з великої кількості шарів з низькотемпературної кераміки, (b) ампліфікування ядерної кислоти шляхом функціонування мікропристрою ПЛР; та (c) визначення наявності чи відсутності аналіту на основі зчитування флуоресцентного сигналу збільшеної ядерної кислоти, або ж визначення наявності чи відсутності хвороботворних організмів на підставі зчитування флуоресцентного сигналу збільшеної ядерної кислоти для діагностування хворобливого стану.

Короткий опис супровідних зображень

Тепер цей винахід буде описано з посиланнями на супровідні зображення:

Фіг. 1 демонструє ортогональну проекцію виконання мікросхеми ПЛР з низькотемпературної кераміки.

Фіг. 2 демонструє поперечний профіль виконання мікросхеми ПЛР з низькотемпературної кераміки.

Фіг. 3 демонструє пошаровий дизайн виконання мікросхеми ПЛР з низькотемпературної кераміки.

Фіг. 4 демонструє блок-схему виконання схеми, яка управляє роботою підігрівача і терморезистора.

Фіг. 5 демонструє модель виконаного дизайну реакційної камери цієї мікросхеми.

Фіг. 6 демонструє процес плавлення фрагменту ДНК лямбди-636 на мікросхемі, використовуючи інтегрований підігрівач/терморезистор, який управляється портативним пристроєм.

Фіг. 7 демонструє процес ампліфікації фрагменту ДНК лямбди-311 шляхом проведення ПЛР на мікросхемі. (а) Флуоресцентний сигнал, отриманий з мікросхеми в режимі реального часу; (b) зображення желеподібної структури, що підтверджує результат ампліфікації.

Фіг. 8 демонструє зображення желеподібної структури обробленої крові та плазми в результаті проведення ПЛР для рибосомної одиниці 16S сальмонели.

Фіг. 9 демонструє зображення желеподібної структури крові в результаті проведення прямої ПЛР для рибосомної одиниці 16S сальмонели.

Фіг. 10 демонструє желеподібну структуру плазми в результаті проведення прямої ПЛР для рибосомної одиниці 16S сальмонели.

Фіг. 11 демонструє процес ампліфікації гену сальмонели шляхом проведення ПЛР, використовуючи мікросхему. (а) флуоресцентний сигнал, отриманий з мікросхеми в режимі реального часу; (b) зображення желеподібної структури, що підтверджує результат ампліфікації.

Фіг. 12 демонструє час, який витрачається на ампліфікування ДНК вірусу гепатиту В, використовуючи мікросхему з низькотемпературної кераміки

Фіг. 13 демонструє криву плавлення для похідної величини флуоресцентного сигналу, отриманого під час плавлення ДНК λ -311, що відбулося шляхом використання мікросхеми з низькотемпературної кераміки.

Детальний опис цього винаходу

Цей винахід стосується мікросхеми, яка складається з великої кількості шарів з низькотемпературної кераміки, в межах якої реакційна камера формується в численні шари реакційної камери для завантаження зразка, провідник вмонтовується, принаймні, в один шар провідника, який розміщується нижче реакційної камери, а підігрівач вбудовано, принаймні, в один нагрівальний шар, що розміщується нижче провідникового шару(шарів).

В одному виконанні цього винаходу реакційна камера накривається прозорим ізоляційним ковпаком.

В одному виконанні цього винаходу до складу мікросхеми входить температурний датчик.

В одному виконанні цього винаходу температурний датчик вмонтовано, принаймні, в один сенсорний шар цієї мікросхеми.

В одному виконанні цього винаходу температурний датчик є терморезистором.

В одному виконанні цього винаходу в мікросхемі передбачені контактні майданчики для приєднання зовнішньої схеми управління до температурного датчика та підігрівача.

В одному виконанні цього винаходу температурний датчик розміщується з зовнішнього боку цієї мікросхеми для вимірювання температури мікросхеми.

В одному виконанні цього винаходу реакційна камера оточена провідниковими кільцями.

В одному виконанні цього винаходу провідникові кільця приєднані до провідникового шару(шарів) за допомогою клем.

В одному виконанні цього винаходу провідник виготовлено з відбірного матеріалу, до складу якого входять золото, срібло, платина і паладій чи сплави цих металів.

В одному виконанні цього винаходу між основою реакційної камери і підігрівачем є щілина, шириною орієнтовно від 0.2мм до 0.7мм.

В одному виконанні цього винаходу зразком слугує харчовий зразок чи біологічний зразок, відібраний з групи, до складу якої входить кров, сироватка, плазма, тканини, слина, мокротиння та сеча.

В одному виконанні цього винаходу об'єм реакційної камери становить приблизно від 1 μ л до 25 μ л.

Цей винахід також стосується методу виготовлення мікросхеми, який складається з таких етапів:

а) розташування в певному порядку множини шарів з низькотемпературної кераміки та передбачення комірки для формування реакційної камери,

б) розміщення, принаймні, одного шару з низькотемпературної кераміки, що має підігрівач нижче цієї камери,

с) розміщення одного чи декількох провідникових шарів між підігрівачем та реакційною камерою; й

д) поєднання шарів для формування мікросхеми.

В одному виконанні цього винаходу передбачається розміщення, принаймні, одного шару з низькотемпературної кераміки, до складу якого входить температурний датчик між підігрівачем і реакційною камерою або нижче підігрівача.

В одному виконанні цього винаходу камера оточена провідниковими кільцями.

В одному виконанні цього винаходу передбачаються клеми для приєднання провідникових кілець до провідникового шару(шарів).

Цей винахід також стосується мікропристрою для ПЛР, який складається з:

а) мікросхема, яка складається з великої кількості шарів з низькотемпературної кераміки, в межах якої реакційна камера формується в численні шари для завантаження зразка, провідник вмонтовується, принаймні, в один шар, який розміщується нижче реакційної камери, а підігрівач вбудовано, принаймні, в один шар, що розміщується нижче провідникового шару(шарів);

б) температурний датчик вбудовано в мікросхему чи розміщено з зовнішнього боку цієї мікросхеми для вимірювання температури мікросхеми,

с) схема управління для управління роботою підігрівача на підставі значення вхідного сигналу температурного датчика; та

д) оптична система для виявлення флуоресцентного сигналу зі зразка.

В одному виконанні цього винаходу цей пристрій є портативним пристроєм.

В одному виконанні цього винаходу цей пристрій керується за допомогою портативної обчислювальної платформи.

В одному виконанні цього винаходу цей пристрій упорядковано в масив для виконання великої кількості ПЛР.

В одному виконанні цього винаходу мікросхема знімається з цього пристрою.

Цей винахід також стосується методу виявлення аналіту в зразку чи діагностування патогенного стану, використовуючи мікро пристрій для ПЛР, цей метод складається з таких етапів:

а) завантаження зразку, що містить ядерну кислоту, в мікросхему, яка складається з великої кількості шарів з низькотемпературної кераміки,

б) ампліфікування ядерної кислоти шляхом функціонування мікропристрою ПЛР; та

с) визначення наявності чи відсутності аналіту на основі зчитування флуоресцентного сигналу збільшеної ядерної кислоти, або ж визначення наявності чи відсутності хвороботворного організму на підставі зчитування флуоресцентного сигналу збільшеної ядерної кислоти для діагностування хворобливого стану.

В одному виконанні цього винаходу ядерною кислотою є або ДНК, або РНК.

В одному виконанні цього винаходу цей метод передбачає здійснення як якісного, так і кількісного аналізу продуктів ампліфікації.

В одному виконанні цього винаходу зразком є зразок харчового матеріалу чи біологічного матеріалу.

В одному виконанні цього винаходу біологічний зразок відібрано з групи, до складу якої входить кров, сироватка, плазма, тканини, слина, мокротиння та сеча.

В одному виконанні цього винаходу хвороботворний організм відібрано з групи, до складу якої входять віруси, бактерії, грибки, дріжджові грибки та найпростіші організми.

Термін "шар реакційної камери" в цьому документі застосовується до будь-якого шару мікросхеми, що бере участь у формуванні реакційної камери, а тому контактує зі зразком.

Термін "провідниковий шар" в цьому документі стосується будь-якого шару цієї мікросхеми, що має вмонтований у неї провідник.

Термін "нагрівальний шар" в цьому документі стосується будь-якого шару мікросхеми, що має вмонтований в неї підігрівач.

5 Полімеразна Ланцюгова Реакція (ПЛР) – це техніка, відкрита для синтезу дублікатів специфічного фрагменту ДНК з еталону. Оригінальний процес ПЛР ґрунтується на термостійкому полімеразному ферменті ДНК з термофільної бактерії (Taq), що може синтезувати додатковий молекулярний ланцюжок в молекулярний ланцюжок заданої ДНК в суміші, яка містить чотири основи ДНК і два фрагменти праймера ДНК, що фланкують ДНК-мішені. Суміш підігрівається для роз'єднання молекулярних ланцюжків двійної спіралі ДНК, яка має ДНК-мішень, а потім – охолоджується для того, щоб праймери мали можливість знайти та зв'язатися з додатковими послідовностями основ ДНК на окремих молекулярних ланцюжках, а полімераза Термофільної бактерії могла розширити праймери в нові додаткові молекулярні ланцюжки. Повторення циклів підігріву та охолодження збільшує ДНК-мішень в геометричній прогресії, оскільки кожний новий подвійний молекулярний ланцюжок розділяється для того, щоб стати двома матрицями для подальшого синтезу.

Типовий температурний профіль для полімеразної ланцюгової реакції є таким:

1. Денатурація при температурі 93 °C протягом 15-30 секунд
2. Ренатурація праймеру при температурі 55 °C протягом 15-30 секунд
3. Збільшення праймерів при температурі 72 °C протягом 30-60 секунд

В якості прикладу, в першому етапі розчин підігрівається до температури 90-95°C таким чином, що матриця з подвійного молекулярного ланцюжка плавиться ("денатурується") для того, щоб сформувати два окремих молекулярних ланцюжка. В наступному етапі вона охолоджується до температури 50-55°C для того, щоб короткі спеціально синтезовані фрагменти ДНК ("праймери") з'єдналися з відповідною додатковою секцією матриці ("ренатурація"). Остаточно розчин підігрівається до температури 72°C, коли особливий фермент ("полімераза ДНК") збільшує праймери шляхом приєднання додаткових основ з розчину. В такий спосіб два ідентичні молекулярні ланцюги синтезуються з одного подвійного молекулярного ланцюга.

Для того, щоб отримати продукти, довжина яких більша, ніж декілька сотень основ, етап розширення праймеру має бути збільшено приблизно на 60 с/к основ. Вказані вище дані є типовими часовими даними для приладів; насправді, етапи денатурації та ренатурації відбуваються майже миттєво, але температурні показники заводських приладів, за звичай, становлять менше, ніж 1 °C /с, у разі якщо металеві блоки чи вода використовуються для теплової рівноваги, а зразки зберігаються в пластикових мікроцентрифужних пробірках.

Шляхом механічної мікрообробки термічно ізольованих ПЛР-камер малої маси; можливо налагодити масовий випуск більш швидкого, більш енергозберігаючого та більш специфічного приладу для проведення ПЛР. До того ж, факт швидких переходів від однієї температури до іншої гарантує те, що на зразок витрачається мінімальна кількість часу при небажаних проміжних температурах для того, щоб збільшена ДНК мала оптимальну точність та чистоту.

Низькотемпературна кераміка – це сучасна версія технології товстої плівки, що використовується в упакуванні електронних компонентів для автомобільної, оборонної, космічної та телекомунікаційної промисловості. Це прозорий керамічний матеріал на основі оксиду алюмінію, що є хімічно інертним, біологічно сумісним, теплостійким (>600°C), має низьку теплопровідність (<3Вт/мК), достатню механічну міцність та забезпечує гарну герметичність. Традиційно він використовується для герметизації електронних пристроїв, що мають мікросхеми, в межах яких він виконує як структурну, так і електричну функції. Ці винахідники визнали прийнятність низькотемпературної кераміки, що має бути використана для мікросхем ПЛР, і наскільки відомо цим винахідникам, низькотемпературна кераміка не застосовувалася раніше в таких цілях. Основними підкладками в технології низькотемпературної кераміки є переважно необпалені (зелені) шари прозорого керамічного матеріалу з полімерною зв'язуючою речовиною. Структурні характеристики формуються шляхом різання/проколювання/просвердлювання цих шарів та накладання великої кількості шарів.

Процес накладання шарів дає можливість формувати тривимірні характеристики, важливі для МЕМС (Мікро-електромеханічних систем). Такі характеристики, як 50 мікрон, можна швидко отримати на низькотемпературній кераміці. Електричні схеми виготовляються шляхом нанесення трафаретного друку за допомогою пасти, яка має характеристики провідності та опору, на кожен шар. Численні шари поєднуються між собою шляхом перфорації міжшарових перехідних отворів та заповнення їх пастою з провідниковими властивостями. Ці шари накладаються, притискаються і обпалюються. В літературі зафіксовано випадки обробки

великої кількості шарів - до 80 шарів. Обпалений матеріал є щільним і має гарну механічну міцність.

Як правило, результат ПЛР аналізується з використанням гель-електрофорезу. Відповідно до цієї техніки фрагменти ДНК після проведення ПЛР розділяються в електричному полі, при цьому їх можна спостерігати, оскільки вони фарбуються за допомогою флуоресцентного фарбника. Більш прийнятною є схема, коли використовується флуоресцентний фарбник, який особливим способом з'єднується з подвійним молекулярним ланцюгом ДНК в цілях здійснення безперервного моніторингу за цією реакцією (ПЛР в режимі реального часу). Прикладом такого фарбника є SYBR GREEN, який збуджується синім світлом величиною в 490 нм і потім випромінює зелене світло величиною 520 нм після з'єднання з ДНК. Інтенсивність світіння знаходиться в пропорційній залежності від кількості продукту ДНК з подвійними молекулярним ланцюгами, що утворилися під час ПЛР, а відтак вона збільшується зі збільшенням кількості циклів.

Фіг. 1 демонструє ортогональну проекцію виконання мікросхеми ПЛР з зазначенням реакційної камери (11) чи комірки. На цій фіг. зазначено скомпонований блок підігрівача (12) і температурний датчик - терморезистор (13) в середині мікросхеми ПЛР з низькотемпературної кераміки. Також зазначені лінії провідника підігрівача (15) та лінії провідника терморезистора (14). Ці лінії провідника допоможуть в забезпеченні зв'язку підігрівача та терморезистора, вбудованих в бокову поверхню, з зовнішньою схемою.

Посилаючись на фіг. 2, на якому показано поперечний профіль виконання мікросхеми ПЛР з низькотемпературної кераміки, де (16a і 16b) позначають контактні майданчики для підігрівача (12), а (17a і 17b) позначають контактний майданчик для терморезистора (13).

Посилаючись на фіг. 3, на якому показано пошаровий дизайн виконання мікросхеми ПЛР з низькотемпературної кераміки, де мікросхема складається з 12 шарів стрічки з низькотемпературної кераміки. Є два базові шари (31), три середні шари, які мають нагрівальний шар (32), провідниковий шар (33) та шар, що має терморезистор (34), в той час як шар (35) формує шар стикування з реакційною камерою (11). Шари реакційної камери (36) складаються з шести шарів, як це показано. Провідниковий шар (33) також вставляється між нагрівальним шаром і шаром терморезистора. Провідникова лінія підігрівача (33) та провідникові лінії терморезистора (32) також позначені. На фіг. показано, що лінії провідника (32) розміщені з іншого боку шару терморезистора (34). Дизайн підігрівача може бути будь-якої форми, наприклад, "драбина", "серпантин", "лінія", "пластина", тощо розміром, який варіює від 0.2мм x 3мм до 2мм x 2мм. Розмір та форму підігрівача можна підібрати на підставі вимог. Вимоги можуть бути такими, наприклад, в залежності від розміру реакційної камери чи зразка, що тестується, або ж матеріалу, який використовується в якості шару провідника.

Фіг. 3 демонструє шаровий дизайн та зображення виконання виготовленої герметичної мікросхеми. Ця мікросхема з низькотемпературної кераміки має достатній об'єм від 1 до 25 $\mu\text{л}$, а варіювання опору (підігрівача і терморезистора) становить приблизно 50 %. Значення опору підігрівача ($\sim 40 \Omega$) та терморезистора ($\sim 1050 \Omega$) узгоджувалися з розрахованими значеннями. Підігрівач базується на резистивному елементі з товстої плівки, що використовується в традиційних упаковках з низькотемпературної кераміки. Система терморезистора з оксиду алюмінію використовується для виготовлення вмонтованих температурних датчиків. Виміряне значення ТКО (температурного коефіцієнту опору) мікросхеми було в діапазоні від 1 до 2 $\Omega/^{\circ}\text{C}$. Мікросхема була виготовлена на екологічно безпечній системі DuPont 951. Шар терморезистора може розміщуватися в будь-якому місці в мікросхемі, або ж температурний датчик може знаходитися з зовнішньої сторони мікросхеми замість терморезистора в середині мікросхеми.

Посилаючись на фіг. 4, на якій показано просторову діаграму виконання схеми, яка контролює підігрівач і терморезистор, в межах якої терморезистор в мікросхемі ПЛР з низькотемпературної кераміки (10) діє в якості одного з плечей мостової схеми (46). Підсилений вихідний сигнал мостової схеми з мостового підсилювача (41) подається в якості вхідного сигналу до ПІД-регулятора (43), де він переводиться в цифрову форму, а ПІД-алгоритм надає цифровий вихідний сигнал, що контролюється. Цей вихідний сигнал знову конвертується в аналогову напругу, це приводить в дію підігрівач, використовуючи силовий транзистор, що входить до складу приводного пристрою підігрівача (46). До того ж, процес обробки низькотемпературної кераміки дешевший у порівнянні з обробкою силікону.

Цей винахід забезпечує можливість удосконалення традиційних систем ПЛР з точки зору часових затрат на здійснення аналізу, портативності, об'єму зразка та можливості виконувати аналіз продуктивності та кількісного вираження. Все це досягається за допомогою портативного мікропристрою ПЛР з можливістю детектування на місці в режимі реального часу /кількісного вираження продуктів ПЛР, до складу якого входить таке:

- Одноразова мікросхема ПЛР, яка складається з реакційної камери(камер), вмонтованого підігрівача і температурного датчика з прозорим ізоляційним ковпаком.

- Портативний електронний прилад, який складається з таких елементів

- Схема управління для підігрівача та температурного датчика.

5 - Флуоресцентна оптична система детектування.

- Смартфон чи ПЦА (персональний цифровий асистент), які працюють на програмі, що управляє вище зазначеним портативним пристроєм.

Одноразова мікросхема ПЛР складається з реакційної камери, що підігрівається за допомогою вмонтованого підігрівача, а вмонтований терморезистор здійснює моніторинг роботи такої камери. Така схема виготовляється з низькотемпературної кераміки і комплектується відповідно з'єднувачем з контактами для підігрівача та температурного датчика.

Вмонтований підігрівач виготовлено з пасти для формування резисторів такої, як серія CF від компанії DuPont, що сумісна з низькотемпературною керамікою. Може використовуватися будь-яка система стрічки з сирової кераміки така, як DuPont 95, ESL (серії 41XXX), Ferro (система А6) або Hageus. Зазначений вище вмонтований температурний датчик є терморезистором, виготовленим з використанням резистивної пасти для формування терморезистора з ПТК (Позитивним Температурним Коефіцієнтом) (Наприклад: 509X D, є ESL 2612 від компанії ESL Electroscience) для підкладок з оксиду алюмінію. ВТК: Від'ємний Температурний Коефіцієнт резистивної пасти такої, як NTC 4993 від компанії EMCA Remex також може застосовуватися.

20 Прозорий (довжина хвилі від 300 до 1000нм) ізоляційний ковпак призначений для попередження випарювання зразка із зазначеної реакційної камери і виготовлений з полімерного матеріалу.

Схема управління складалася б з двопозиційної схеми управління "ввімкнено/вимкнено" чи ПІД (пропорційно-інтегрально-диференціальної) схеми управління, яка б здійснювала управління роботою підігрівача, виходячи з вихідного сигналу, отриманого з мостової схеми, частиною якої був би вмонтований терморезистор. Метод управління роботою підігрівача та зчитування значень температурного датчика, що оприлюднюється в цьому документі, наводиться виключно в ілюстративних цілях. Цей метод не слід розглядати як єдиний спосіб для здійснення управління чи як обмеження. Інші засоби та методи управління роботою підігрівача й зчитування значень терморезистора є достатньо прийнятні для застосування на думку сторони, яка оприлюднює цю інформацію.

Флуоресцентна оптична система детектування складалася б з джерела збудження світлодіоду (Діоду, що випромінює світло) та світіння, виявленого за допомогою фотодіода. Ця система складалася б з оптичних волокон, які б використовувалися для проєкції світла на зразок. Оптичне волокно також можна використовувати для направлення світла на фотодіод. Світлодіод і фотодіод приєднуються до оптичного волокна за допомогою відповідного фільтру смуги пропускання. Для точного вимірювання величини вихідного сигналу з фотодетектора потрібна схема, яка має надзвичайно гарне співвідношення величини сигналу до величини шуму. Флуоресцентна система детектування, оприлюднена в цьому документі, є лише прикладом. Її не слід розглядати як єдиний спосіб детектування чи як обмеження. Будь-який флуоресцентний детектор працюватиме до тих пір, поки він буде здатним проєктуватися на зразок.

Цей винахід забезпечує ринкову портативну систему для ПЛР, яка застосовується для спеціального діагностування. ПЦА має контрольне програмне забезпечення, що працює для забезпечення повної портативної системи для ПЛР з можливістю детектування в режимі реального часу та управління за допомогою програмного забезпечення.

Зменшуючи теплоємність та покращені коефіцієнти нагрівання /охолодження за допомогою цього пристрою, час, що складав від 2 до 3 годин, для завершення проведення реакції в 30-40 циклів, навіть для об'єму вибірки середнього розміру в 5-25 μ л, було скорочено менше, ніж до 30 хвилин. Фіг. 12 демонструє час, що займає процес збільшення ДНК вірусу Гепатиту В з використанням мікросхеми з низькотемпературної кераміки, представленої цим винаходом. ПЛР проходила 45 циклів і могла досягнути процесу збільшення впродовж 45 хвилин. В подальшому процес збільшення спостерігався, коли ПЛР проходила 45 циклів через 20 хвилин, а також 15 хвилин. Традиційно тривалість ПЛР для ДНК вірусу гепатиту В (45 циклів) становила би орієнтовно 2 години.

Мініатюризація дозволяє отримувати точні зчитування при зразках меншого розміру та споживанні меншого об'єму недешевих реагентів. Маленька теплоємність Мікросистем і маленькі розміри зразків дозволяють виконувати процес стрімкого малопотужного циклічного температурного впливу, збільшуючи швидкість багатьох процесів таких, як реплікація ДНК за допомогою мікро-ПЛР. До того ж, хімічні процеси, що перебувають в залежності від процесів

хімії поверхні, значно покращуються завдяки співвідношенням збільшеної поверхні до об'єму, що наявні в мікромасштабі. Переваги мікро-флюїдики спричинили потребу у невідкладній розробці інтегрованої мікросистеми для проведення хімічного аналізу.

Таким чином, мікросхема, що перенесена в портативний пристрій (109), витісняє станок ПЛР з провідних лабораторій, тим самим збільшуючи діапазон застосування цієї надзвичайно потужної техніки, будь-то в сфері клінічного діагностування, чи в сфері тестування харчових продуктів, чи в сфері скринінгу крові в банках крові, чи в багатьох інших сферах застосування.

Існуючі інструменти ПЛР з багатьма реакційними камерами забезпечують роботу всіх численних досліджуваних сайтів ДНК на одному й тому ж самому температурному протоколі, а відтак вони не є раціональними з точки зору часу. Виникає необхідність в мінімізації часу протікання реакції та вхідного об'єму зразка.

Для виконання поточної ПЛР, запланованої в майбутньому, міг би бути ряд пристроїв, що мають дуже швидку температурну реакцію і дуже добре ізольовані від суміжних мікросхем ПЛР для того, щоб мати можливість ефективно і незалежно один від одного проводити велику кількість реакцій з різними температурними протоколами та мінімальними перешкодами.

Аналіз або метод кількісного вираження продуктів ПЛР реалізується на практиці шляхом інтеграції системи виявлення світіння в режимі реального часу. Ця система також могла би бути інтегрована з системою кількісного вираження та сенсорною системою з метою виявлення хвороб таких, як Гепатит В (Фіг. 12), СНІД, туберкульоз, тощо. До інших ринків збуту належить ринок моніторингу якості харчових продуктів, аналіз ДНК, криміналістика та моніторинг стану оточуючого середовища.

Після встановлення узгодженості температурного профілю в межах мікросхеми, були виконані полімеразні ланцюгові реакції на цих мікросхемах. Успішно були збільшені фрагменти ДНК лямбди та ДНК сальмонели з використанням цих мікросхем. Фіг. 5 демонструє тривимірний вигляд мікросхеми із позначенням різноманітних з'єднань з підігрівачем, провідниковими кільцями, терморезистором і провідниковими кільцями (52). На ньому також показані клеми (51), за допомогою яких приєднуються провідникові кільця (52) до пластини провідника (33).

Фіг. 6 демонструє порівняльний графік плавлення фрагменту ДНК λ -636 на мікросхемі з використанням інтегрованого підігрівача і терморезистора.

Фіг. 7 демонструє збільшення інтенсивності флуоресцентного сигналу, що пов'язано зі збільшенням ДНК λ -311. Температурний профіль контролювався портативним пристроєм, а реакція виконувалася на мікросхемі (реакційна суміш, об'ємом в 3 μ л, та мастило, об'ємом в 6 μ л). Моніторинг світіння проводився з використанням традиційного синхронного підсилювача.

Також передбачається застосування поточного винаходу для діагностичних систем. Процедура, яка прийнята для розробки діагностичної системи, є такою, що має спочатку стандартизувати температурні протоколи для низки проблем, а потім вже функціонувати на мікросхемі. Праймери, призначені для фрагменту рибосомної ДНК 16S, збільшеної на ~ 300-400 пар нуклеотидів з кишкової палички і сальмонели, в той час як праймери для фрагменту гена *stn*, збільшеного на ~ 200 пар нуклеотидів з *Salmonella typhi*. Отримані продукти було підтверджено шляхом детектування зеленого світіння фарбника SYBR, а також за допомогою електрофорезу в агарозному гелі. Фіг. 7 та 11 демонструють зображення желеподібної структури збільшеної ДНК λ -311 та гену сальмонели з використанням мікросхеми.

Температурний профіль для збільшення ДНК λ -311:

Денатурація: 94 °C (90с)

94 °C (30с) - 50 °C (30с) - 72 °C (45с)

Розширення: 72 °C (120с)

Температурний профіль для збільшення гену сальмонели:

Денатурація: 94 °C (90с)

94 °C (30с) - 55 °C (30с) - 72 °C (30с)

Розширення: 72 °C (300с)

ПЛР з обробленою кров'ю та плазмою

Кров чи плазма оброблені осаджувальною речовиною, що може осаджувати основні речовини-інгібітори ПЛР з цих зразків. Прозорий супернатант було використано в якості матриці. Використовуючи цей протокол, було проведено збільшення для фрагменту з ~ 200 пар нуклеотидів з *Salmonella typhi* (фіг. 8). На фіг. 8 з зображенням гель-електрофорезу показано

1. контрольна реакція,
2. продукт ПЛР – кров без обробки,
3. продукт ПЛР- оброблена кров,
4. продукт ПЛР- оброблена плазма

5 Буфер крові для прямої ПЛР

Для прямої ПЛР зі зразками крові чи плазми був створений унікальний буфер. Використовуючи цю унікальну буферну систему, було досягнуто збільшення об'єму крові та плазми за допомогою прямої ПЛР. Завдяки цій буферній системі вдалося досягнути до 50 % збільшення клітин для крові та до 40 % - для плазми (див. Фіг. 9 і 10), використовуючи

10 мікросхему з низькотемпературної кераміки цього винаходу.

На фіг. 9 зображення гель-електрофорезу показує

1. Продукт ПЛР - 20 % крові,
2. Продукт ПЛР - 30 % крові,
3. Продукт ПЛР - 40 % крові,
4. Продукт ПЛР - 50 % крові та

15

На фіг. 10 зображення гель-електрофорезу показує

1. Продукт ПЛР - 20 % плазми,
2. Продукт ПЛР - 30 % плазми,
3. Продукт ПЛР - 40 % плазми,
4. Продукт ПЛР - 50 % плазми,

20

5. контрольна реакція

Цей унікальний буфер складається з буферної солі, хлориду чи сульфату, що містить двовалентний іон, неіонічний детергент, стабілізатор і цукровий спирт.

25 Фіг. 13 демонструє криву плавлення, побудовану для похідної величини флуоресцентного сигналу для плавлення ДНК λ -311 на мікросхемі з низькотемпературної кераміки. На цій фіг. також проводиться порівняння поточного винаходу (131) та традиційного пристрою ПЛР (132).

Гостріша вершина: максимальне значення/ширина (вісь x) @ половинна величина піку = 1.2/43

30 Мілкіша вершина: максимальне значення/ширина (вісь x) @ половинна величина піку = 0.7/63

Вище співвідношення позначає гострішу вершину. Також на цьому графіку вісь y - це похідна величина (спад кривої плавлення), вищий спад позначає гострішу вершину плавлення.

ФОРМУЛА ВІНАХОДУ

35

1. Мікрочип, виготовлений з низькотемпературних керамічних шарів, складається з:

- a) реакційної камери, сформованої з великої кількості шарів, для завантаження зразка,
- b) дрових кілець навколо реакційної камери, та
- c) нагрівача, поміщеного в щонайменше один шар, для подачі тепла в дрові кільця.

40

2. Мікрочип згідно з пунктом 1, в якому нагрівач подає тепло до дрових кілець через провідник, поміщений в щонайменше один шар, який бажано розміщувати понизу реакційної камери.

3. Мікрочип згідно з пунктом 2, в якому дрові кільця з'єднані і провідним шаром (шарами).

45

4. Мікрочип згідно з пунктом 1, в якому чип містить температурний датчик, який знаходиться ззовні чипа або поміщений в щонайменше один шар чипа.

5. Мікрочип згідно з пунктом 1, в якому чип містить контактні виводи для з'єднання зовнішнього ланцюга управління з температурним датчиком та нагрівачем.

50

6. Мікрочип згідно з пунктом 1, в якому база реакційної камери та нагрівач мають зазор в межах від близько 0,2 мм до близько 0,7 мм.

7. Мікрочип згідно з пунктом 1, в якому реакційна камера має об'єм в межах від близько 1 μ l до близько 25 μ l.

8. Метод виготовлення мікрочипа складається з таких кроків:

55

a) упорядкування великої кількості шарів, виконаних з низькотемпературної кераміки та створення гнізда для формування реакційної камери, в якому камера оточена провідними кільцями,

b) нанесення щонайменше одного шару низькотемпературної кераміки, що містить нагрівач, який знаходиться понизу камери,

60

c) нанесення одного або декількох провідних шарів між нагрівачем і реакційною камерою, та

d) взаємне з'єднання шарів для формування мікрочипа.

9. ПЛР-мікропристрій, який складається з:

а) мікрочипа, виготовленого з низькотемпературних керамічних шарів, що складається з: реакційної камери, сформованої з великої кількості шарів, для завантаження зразка, дровових кілець навколо реакційної камери та нагрівача, поміщеного в щонайменше один шар, для подачі тепла в дровові кільця,

б) температурного датчика, який поміщений в мікрочип або ззовні чипа для вимірювання температури чипа,

в) ланцюга управління для управління нагрівачем на основі даних температурного датчика; та

г) оптичної системи для прийому флуоресцентного сигналу зі зразка.

10. ПЛР-мікропристрій згідно з пунктом 9, в якому пристрій є портативним пристроєм, який управляється портативною комп'ютерною платформою.

11. ПЛР-мікропристрій згідно з пунктом 9, в якому мікрочип має форму блока для здійснення великої кількості ПЦР.

12. ПЛР-мікропристрій згідно з пунктом 9, в якому мікрочип може від'єднуватися від пристрою.

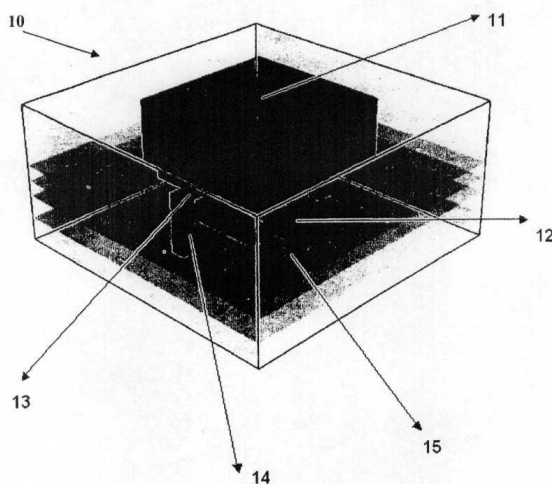
13. Спосіб виявлення аналіту в зразку або діагнозу стану хвороби з використанням ПЛР-мікропристрою складається з таких кроків:

а) завантаження зразка, що містить полінуклеотид у мікрочип з реакційною камерою, оточеною дрововими кільцями, що здійснює ампліфікацію полінуклеотиду за допомогою ПЛР-мікропристрою; та

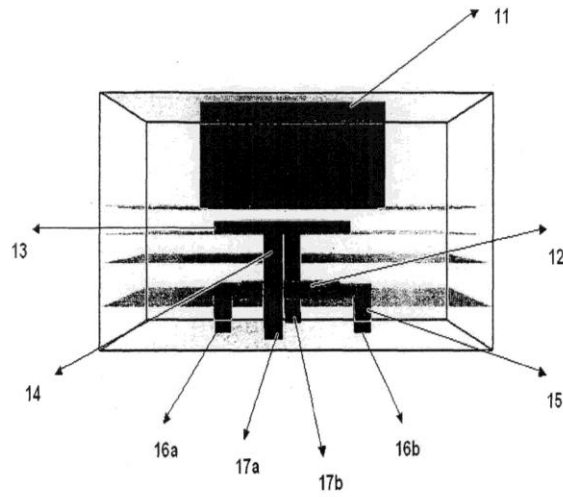
б) виявлення присутності чи відсутності аналіту на основі флуоресцентного зчитування ампліфікованого полінуклеотиду, або виявлення присутності чи відсутності патогену на основі флуоресцентного зчитування ампліфікованого полінуклеотиду для діагностики стану хвороби.

14. Спосіб згідно з пунктом 13, в якому полінуклеотидом є або ДНК, або РНК.

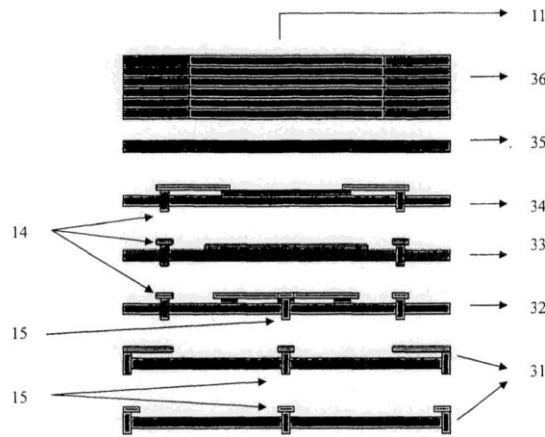
15. Спосіб згідно з пунктом 13, який забезпечує проведення як якісного, так і кількісного аналізу продуктів ампліфікації.



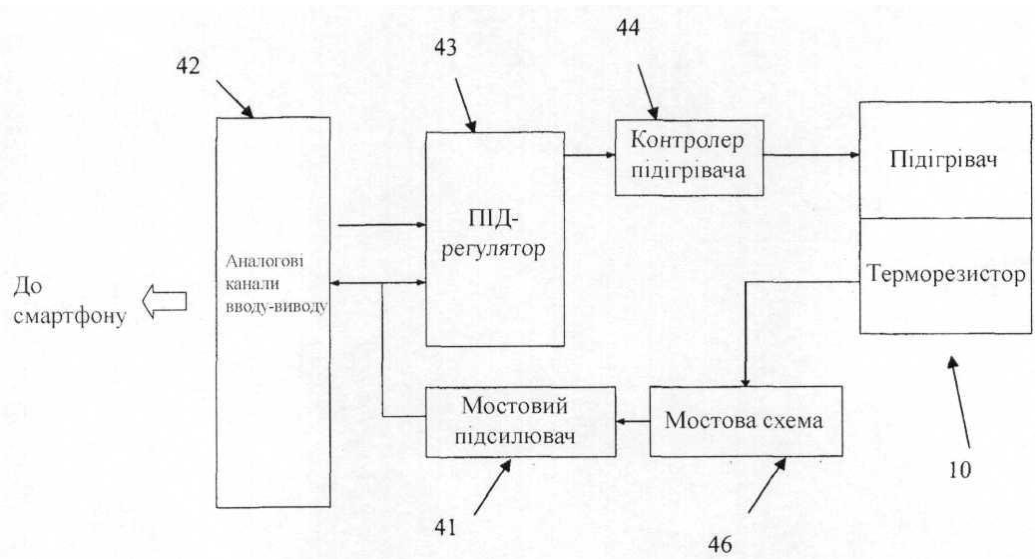
Фіг. 1



Фіг. 2



Фіг. 3



Фіг. 4

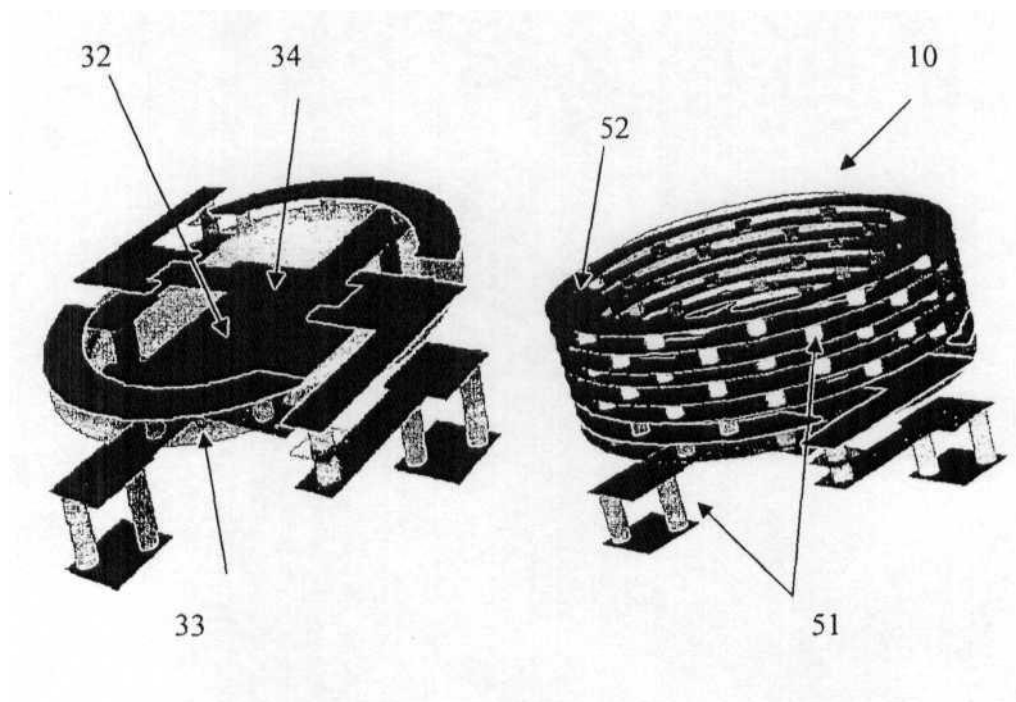


Fig. 5

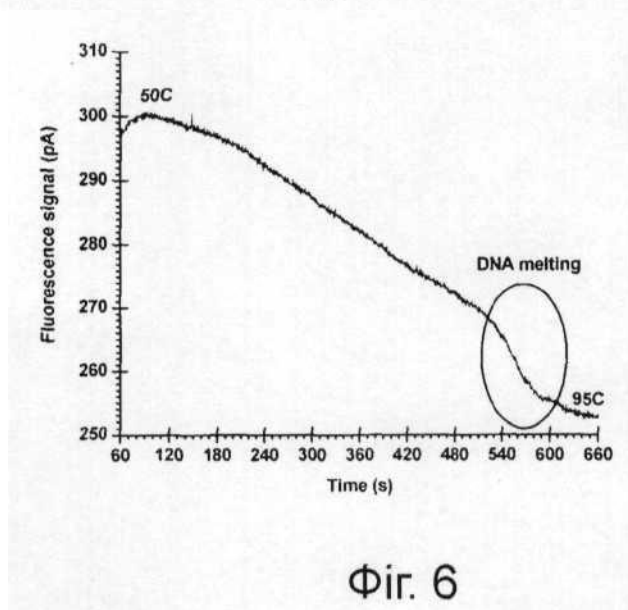


Fig. 6

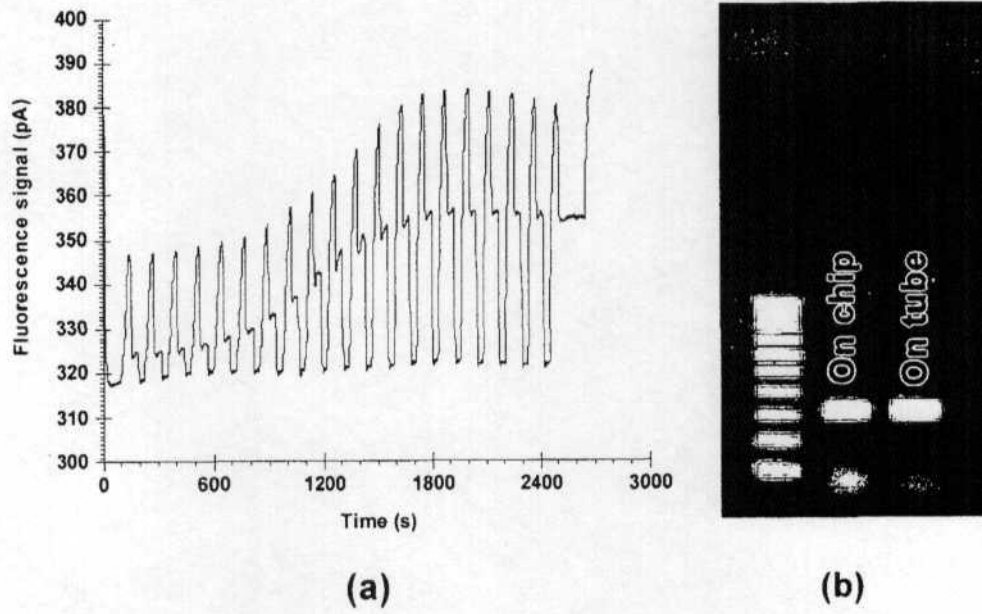


Fig. 7



Fig. 8

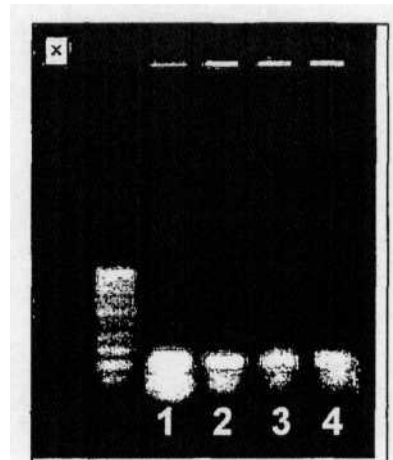


Fig. 9

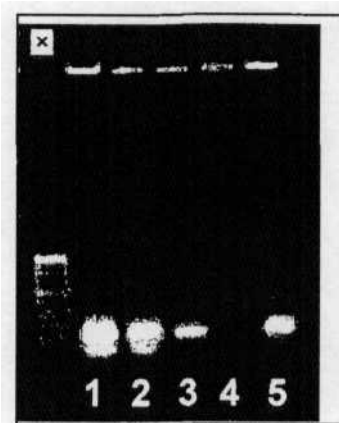


Fig. 10

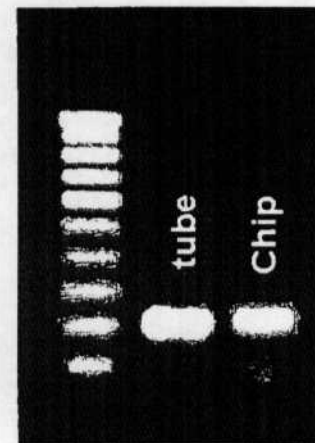
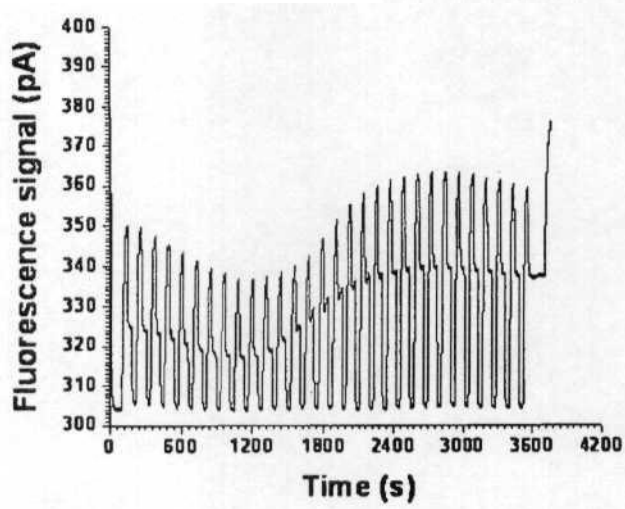
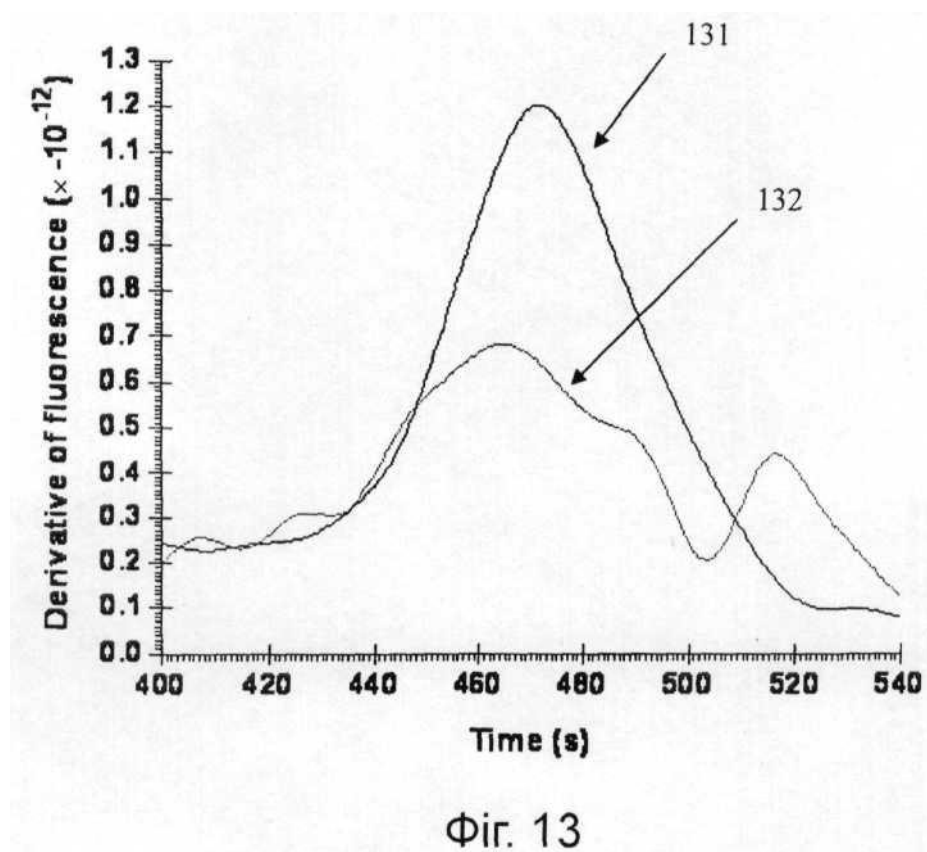


Fig. 11



Fig. 12



Комп'ютерна верстка А. Крижанівський

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601