



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) UA

(11) 100388

(13) C2

(51) МПК

G01N 33/48 (2006.01)

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

|   |  |  |   |
|---|--|--|---|
| (21) Номер заявки:  | а 2010 04268   | (72) Винахідник(и):                                      | Кумар Кішоре Крішна (IN),<br>Джаяраман Равіпракаш (IN),<br>Нарасімха Санкарананд Кайра (IN),<br>Раднакрішнан Ренджіх Махіладеві (IN),<br>Вісванатхан Сахиадіп (IN),<br>Наір Чандрасекхар Бхаскаран (IN),<br>Суббарао Пілларісетті Венката (IN),<br>Джаганнах Мандула (IN),<br>Ченнакрішнаіах Шілпа (IN),<br>Мондал Судіп (IN),<br>Венкатараман Венкатакрішнан (IN)  |
| (22) Дата подання заявки:   | 13.10.2008   | (73) Власник(и):   | БІГТЕК ПРАЙВЕТ ЛІМІТЕД,<br>II Floor, SID Entrepreneurship Building, IISC<br>Campus, Malleshwaram, Bangalore 560 012,<br>Karnataka, India (IN)   |
| (24) Дата, з якої є чинними<br>права на винахід:  | 25.12.2012   | (74) Представник:  | Рогуля Ольга Петрівна, реєстр. №233   |
| (31) Номер попередньої<br>заявки відповідно до<br>Паризької конвенції:                        | 02313/CHE/2007,<br>02312/CHE/2007,<br>02314/CHE/2007,<br>02311/CHE/2007,<br>02328/CHE/2007 | (56) Перелік документів, взятих до уваги<br>експертизою: | SADLER, D.G. ET AL.: 'Thermal Management<br>of BioMEMS: Temperature Control for<br>Ceramic- Based PCR and DNA Detection<br>Devices' IEEE TRANSACTIONS ON<br>COMPONENTS AND PACKAGING<br>TECHNOLOGIES vol. 26, no. 2, June 2003,<br>pages 309 - 316.<br>GOLONKA, L.J. ET AL.: 'LTCC based<br>microfluidic system with optical detection'<br>SENSORS AND ACTUATORS B: CHEMICAL<br>vol. 111-112, November 2005, pages 396 -<br>402.<br>MARTINEZ-CISEROS C.S ET AL.: 'LTCC<br>microflow analyzers with monolithic integration<br>of thermal control' SENSORS AND<br>ACTUATORS A: PHYSICAL vol. 138, no. 1,<br>July 2007, pages 63 - 70. |
| (32) Дата подання<br>попередньої заявки<br>відповідно до<br>Паризької конвенції:              | 12.10.2007,<br>12.10.2007,<br>12.10.2007,<br>12.10.2007,<br>15.10.2007                     |  |   |
| (33) Код держави-учасниці<br>Паризької конвенції,<br>до якої подано<br>попередню заявку:      | IN,<br>IN,<br>IN,<br>IN,<br>IN   |  |   |
| (41) Публікація відомостей<br>про заявку:   | 12.09.2011, Бюл.№ 17   |  |   |
| (46) Публікація відомостей<br>про видачу патенту:   | 25.12.2012, Бюл.№ 24   |  |   |
| (86) Номер та дата<br>подання міжнародної<br>заявки, поданої<br>відповідно до<br>Договору РСТ | PCT/IN2008/000665,<br>13.10.2008   |  |   |

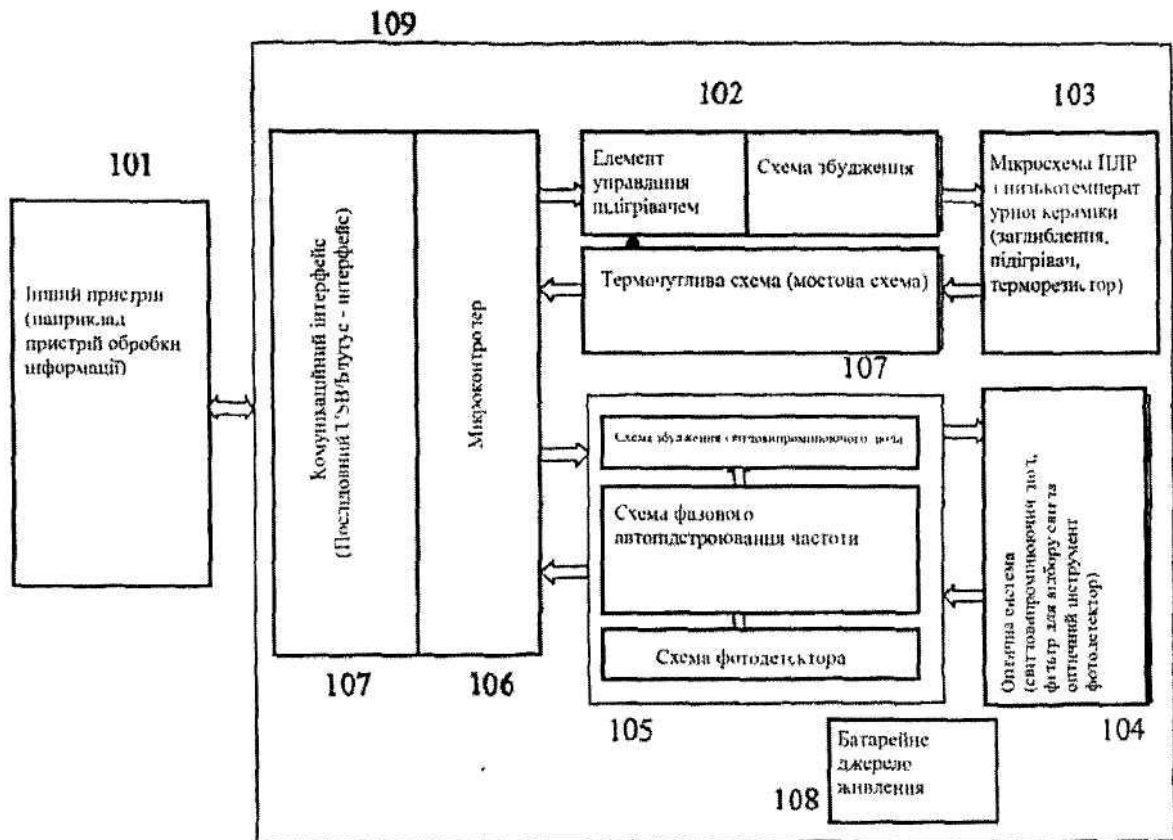
## (54) ПОРТАТИВНИЙ МІКРОПРИСТРІЙ ДЛЯ ПЛР

### (57) Реферат:

Винахід належить до портативного мікропристрою ПЛР, який складається з мікросхеми ПЛР з низькотемпературної кераміки, що містить підігрівач, реакційну камеру для завантаження зразка. Також вона містить елемент управління підігрівачем для регулювання роботи підігрівача на базі вхідного сигналу, отриманого з температурного датчика. Також він має оптичну систему, до складу якої входить оптичне волокно для виявлення флуоресцентного сигналу від зразка і

UA 100388 C2

принаймні один комунікаційний інтерфейс для обміну інформацією з іншим пристроєм (пристроями).



Фіг.1

Область техніки, до якої належить винахід

Цей винахід стосується портативної системи для ПЛР, що працює в режимі реального часу, з одноразовою мікросхемою ПЛР, яку виготовлено з багатошарової кераміки при низьких температурах (LTCC). Цей винахід надалі описує метод контролю та моніторингу роботи мікро-пристрою ПЛР та апаратури, що використовується для проведення ПЛР.

Передумови створення винаходу

За останні п'ять років надзвичайно розширилась науково-дослідна робота в сфері розробки клінічних діагностичних систем на основі технологій «лабораторія на мікросхемі». На такі системи покладаються великі надії в області клінічної діагностики. Вони споживають пробний матеріал та реагенти лише в надзвичайно малих об'ємах. Окремі маленькі мікросхеми можуть бути недорогими й одноразовими. Часовий проміжок між відбором зразків і отриманням результатів має тенденцію бути дуже коротким. Мікросхеми найбільш досконалих дизайнів можуть виконувати всі аналітичні функції - відбір зразків, попередня обробка зразків; етапи сепарації, розчинення та змішування; хімічні реакції; та детектування в єдиній інтегрованій мікрорідинній схемі. Системи на основі «лабораторій на мікросхемі» дають можливість розробникам створювати невеликі за розміром, портативні, зносостійкі, дешеві та прості у застосуванні діагностичні пристрої, які мають високий рівень продуктивності та універсальності. Мікрорідина - рідина, яка протікає в мікроканалі, що дозволяє спроектувати аналітичні пристрої та формати таким чином, що вони не мали б можливості функціонувати в більшому масштабі.

Технології «Лабораторія на мікросхемі» намагаються імітувати лабораторні процедури, які би проводилися на зразку в межах Мікротехнологічної структури. Найбільш успішними є пристрої, які працюють на рідинних зразках. На цих пристроях було продемонстровано велику кількість процедур хімічної обробки, очистки та хімічної реакції. Для виготовлення пристроїв, які виконують повну процедуру хімічного вимірювання, було продемонстровано певну ступінь монолітної інтеграції хімічних процесів. Такі пристрої базуються винятково на лабораторних процедурах аналізу і тому мають можливість акумулювати більш комплексні матриці зразка у порівнянні з традиційним хімічним розпізнаванням.

Останні досягнення в молекулярній та клітинній біології було зроблено значною мірою внаслідок розвитку стрімких і ефективних аналітичних технік. Завдяки мініатюризації та мультиплексуванню такі 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 матеріалу, зразках, 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 останніх років технологія мікро-обробки 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.

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.

Низькотемпературна кераміка використовується в пакувальних напівпровідникових пристроях. Така система дозволяє інтегрувати електричну та структурну функцію. Послідовність виготовлення шар за шаром в процесі створення низькотемпературної кераміки дає можливість легко формувати тривимірні структури з інтегрованими електричними елементами. До того ж, у порівнянні з обробкою силікону, обробка цієї кераміки обходиться дешевше. Мікросхема, що виготовляється на керамічній підкладці такої, як низькотемпературна кераміка дає можливість інтегрувати механічні та електричні елементи в простий і дешевий спосіб.

Використання портативної обчислювальної платформи такої, як ПЦА забезпечує систему достатньою обчислювальною потужністю з метою контролю електроніки та забезпечення інтенсивного і водночас простого інтерфейсу користувача для виводу даних. Така платформа також робить всю систему модульною, а відтак дає можливість користувачу легко модернізувати систему з мінімальними затратами з боку користувача.

Цілі винаходу

Основна мета цього винаходу полягає в розробці портативного мікропристрою для проведення ПЛР.

5 Ще однією метою цього винаходу є розробка методу для здійснення моніторингу й контролю за роботою портативного мікропристрою ПЛР.

Викладення суті винаходу

10 Цей винахід відповідно представляє портативний мікропристрій ПЛР, який складається з: мікросхеми ПРЛ, виготовленої з низькотемпературної кераміки, що має підігрівач, реакційної камери для завантаження зразка, елемента управління підігрівачем для регулювання роботи підігрівача в залежності від вхідного сигналу, отриманого з температурного датчика, оптичної системи детектування для виявлення флуоресцентного сигналу зі зразка, та принаймні одного комунікаційного інтерфейсу для взаємодії з іншим пристроєм (пристроями); також представлено метод для здійснення моніторингу та контролю за роботою портативного мікропристрою ПЛР; згаданий метод має такі етапи: встановлення зв'язку між портативним мікропристроєм ПЛР за допомогою комунікаційного інтерфейсу, ініціювання процесу теплового циклічного впливу на підставі значень температурного профілю, одержаних з іншого пристрою, з метою контролю мікросхеми ПРЛ з низькотемпературної кераміки, та направлення оптичного сигналу, виявленого оптичною системою, до іншого пристрою.

Короткий опис супровідних зображень

20 Тепер цей винахід буде описано з посиланням на супровідні зображення:

Рисунок 1 демонструє схему зображення мікропристрою ПЛР з низькотемпературної кераміки відповідно до цього винаходу.

Рисунок 2 демонструє ортогональну проекцію зображення мікросхеми ПРЛ з низькотемпературної кераміки.

25 Рисунок 3 демонструє профіль зображення мікросхеми ПРЛ з низькотемпературної кераміки.

Рисунок 4 демонструє пошаровий дизайн зображення мікросхеми ПРЛ з низькотемпературної кераміки.

Рисунок 5 демонструє модель виконаного дизайну реакційної камери мікросхеми.

30 Рисунок 6 демонструє розгалужену систему оптичного детектування з використанням розгалуженого оптичного волокна.

Рисунок 7 демонструє блок-схему схеми, за допомогою якої здійснюється контроль роботи підігрівача та температурного датчика.

35 Рисунок 8 демонструє процес плавлення фрагменту ДНК лямбди-636 на мікросхемі з використанням інтегрованого підігрівача/терморезистора, що керується за допомогою портативного пристрою.

Рисунок 9 демонструє процес ПРЛ-ампліфікації фрагменту ДНК лямбди-311 на мікросхемі, (а) Флуоресцентний сигнал, отриманий з мікросхеми в режимі реального часу; (b) Зображення желеподібної структури, що підтверджує результат ампліфікації.

40 Рисунок 10 демонструє зображення желеподібної структури ампліфікації обробленої крові та плазми для рибосомної одиниці 16S сальмонели шляхом ПЛР.

Рисунок 11 демонструє зображення желеподібної структури ампліфікації крові для рибосомної одиниці 16S сальмонели шляхом прямої ПЛР.

45 Рисунок 12 демонструє зображення желеподібної структури ампліфікації плазми рибосомної одиниці 16S сальмонели шляхом прямої ПЛР.

Рисунок 13 демонструє процес ампліфікації гена сальмонели шляхом ПЛР з використанням мікросхеми, (а) флуоресцентний сигнал, отриманий з мікросхеми в режимі реального часу; (b) зображення желеподібної структури, що підтверджує результат ампліфікації.

50 Рисунок 14 демонструє час, що витрачається на процес ампліфікації ДНК вірусу гепатиту В з використанням мікросхеми, виготовленої з низькотемпературної кераміки.

Рисунок 15 демонструє загальний вигляд прикладної програми Personal Digital Assistant (PDA- Персональний Цифровий Асистент - ПЦА), що взаємодіє з портативним пристроєм.

55 Рисунок 16 демонструє криву плавлення для похідної величини флуоресцентного сигналу, отриманого під час плавлення ДНК лямбди-311, що відбулося шляхом використання мікросхеми з низькотемпературної кераміки.

Рисунок 17 демонструє блок-схему програми циклічного температурного впливу, що працює в межах ПЦА.

Рисунок 18 демонструє флуоресцентний сигнал ампліфікованого ДНК вірусу гепатиту В, що отримано в режимі реального часу з використанням мікросхеми.

Рисунок 19 демонструє систему оптичного детектування, яка використовує світлорозділювач.

Рисунок 20 демонструє комбіновану систему оптичного детектування.

Детальний опис винаходу

5 Цей винахід стосується портативного мікропристрою ПЛР, що складається з:

а) Мікросхема ПЛР з низькотемпературної кераміки, який складається з підігрівача, реакційної камери для завантаження зразка,

б) Елемент управління підігрівачем для регулювання роботи підігрівача в залежності від вхідного сигналу, отриманого з температурного датчика,

10 с) Система оптичного детектування для виявлення флуоресцентного сигналу зі зразка, та

d) Принаймні, одного комунікаційного інтерфейсу для взаємодії з іншими пристроями.

В одному виконанні цього винаходу забезпечується, принаймні, один шар провідника між підігрівачем і реакційної камерою.

В одному виконанні цього винаходу реакційна камера оточена провідниковими кільцями.

15 В одному виконанні цього винаходу провідникові кільця з'єднані з шаром провідника за допомогою клею.

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

20 В одному виконанні цього винаходу температурний датчик розміщено з зовнішнього боку мікросхеми з метою вимірювання температури мікросхеми.

В одному виконанні цього винаходу температурний датчик вбудовано, принаймні, в один шар мікросхеми.

В одному виконанні цього винаходу температурний датчик є терморезистором.

25 В одному виконанні цього винаходу температурний датчик приєднано як одне плече мостової схеми.

В одному виконанні цього винаходу вихідний сигнал мостової схеми підсилюється перед його подачею до елемента управління підігрівачем з метою регулювання підігрівача.

В одному виконанні цього винаходу мікросхема має прозорий ізоляційний ковпак, що призначений для закривання реакційної камери.

30 В одному виконанні цього винаходу мікросхема є одноразовою.

В одному виконанні цього винаходу система оптичного детектування відібрана з групи, до складу якої входять система оптичного детектування зі світлорозділювачем, комбінована система оптичного детектування і розгалужена система оптичного детектування.

35 В одному виконанні цього винаходу оптична система складається з джерела світла і фотодетектора для виявлення флуоресцентного сигналу зі зразка.

В одному виконанні цього винаходу синхронний підсилювач підсилює виявлений сигнал.

40 В одному виконанні цього винаходу в розгалуженій оптичній системі використовується розгалужене оптичне волокно з джерелом світла, що розміщується на одному розгалуженому кінці (605a), та фотодетектором, розміщеним на іншому розгалуженому кінці (605a) оптичного волокна.

В одному виконанні цього винаходу спільний кінець (605b) розгалуженого оптичного волокна вказує на зразок.

В одному виконанні цього винаходу в комбінованій оптичній системі детектування використовується оптичне волокно для направлення світла на зразок.

45 В одному виконанні цього винаходу в комбінованій оптичній системі детектування використовуються лінзи для фокусування випущеного променя зі зразка.

В одному виконанні цього винаходу комунікаційний інтерфейс відібрано з групи, до складу якої входять послідовний порт, USB, Блутус чи їх поєднання.

50 В одному виконанні цього винаходу інший пристрій здійснює збір даних щодо температури мікросхеми та щодо підсиленого сигналу з портативного пристрою.

В одному виконанні цього винаходу інший пристрій зібрано з групи, до складу якої входить смартфон, ПЦА та пристрій з програмним управлінням.

Цей винахід також стосується методу моніторингу та контролю роботи портативного мікропристрою ПЛР, згаданий метод складається з таких етапів:

55 а) Встановлення взаємодії між портативним мікропристроєм ПЛР та іншим пристроєм за допомогою комунікаційного інтерфейсу,

б) Ініціювання процесу циклічного температурного впливу в залежності від значень температурного профілю, отриманих з іншого пристрою, з метою управління мікросхемою ПЛР з низькотемпературної кераміки, та

60 с) Направлення оптичного сигналу, виявленого оптичною системою, до іншого пристрою.

Одне виконання цього винаходу передбачає подачу користувачем значень температурного профілю в інший пристрій за допомогою інтерфейсу користувача.

В одному виконанні цього винаходу передбачається створення, модифікація та видалення значень температурного профілю за допомогою інтерфейсу користувача.

5 В одному виконанні цього винаходу іншим пристроєм передбачається здійснення процесу ідентифікації користувача.

В одному виконанні цього винаходу інший пристрій зберігає велику кількість значень температурного профілю.

10 В одному виконанні цього винаходу значення температурного профілю передбачає встановлену величину і кількість циклів.

В одному виконанні цього винаходу передбачається підтримання роботи мікросхеми при температурі та протягом періоду часу, що визначений встановленою величиною.

В одному виконанні цього винаходу передбачається приведення температури мікросхеми ПЛР до кімнатної температури шляхом зупинення процесу циклічного температурного впливу.

15 В одному виконанні цього винаходу передбачається підтримання постійної температури мікросхеми ПЛР протягом періоду тимчасового припинення процесу циклічного температурного впливу.

В одному виконанні цього винаходу передбачається взаємодія з іншим пристроєм за допомогою використання мобільного стеку для профілю послідовного порту Блутус.

20 В одному виконанні цього винаходу передбачається побудова графіку на дисплеї іншого пристрою за термальними та оптичними даними.

Інший пристрій (101) - це пристрій, який може взаємодіяти з портативним пристроєм за допомогою будь-якого стандартного комунікаційного інтерфейсу (107), наприклад, проводового послідовного порту (послідовний порт RS232, USB) чи безпроводового (Блутус, що виконує профіль послідовного порту), тощо.

25 Мікросхема ПЛР з низькотемпературної кераміки - це мікросхема для ПЛР, виготовлена з шарів низькотемпературної кераміки. Ця мікросхема може легко прикріплюватися чи зніматися з портативного пристрою.

30 Температурний профіль має значення температури та часу, що є установленими величинами, а також передбачає рахунок кількості циклів з метою здійснення процесу циклічного температурного впливу.

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-мішень. Суміш підігрівается 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:

- 45
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 підігрівается 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"). Остаточну розчин підігрівается 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.

60 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  $1^{\circ}\text{C}/\text{с}$ , 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 ( $>600^{\circ}\text{C}$ ), має низьку теплопровідність ( $<3\text{Вт/мК}$ ), 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.

Рисунок 1 демонструє схематичний вигляд виконання мікропристрою ПЛР, на якому вказані різні компоненти та їхні функції. Цей пристрій складається з одноразової мікросхеми ПЛР з низькотемпературної кераміки (103), що має реакційну камеру для зберігання зразка з вбудованим підігрівачем та вбудованим температурним датчиком для процесу циклічного температурного впливу. Температурний датчик - це терморезистор. Температурний датчик може також розміщуватися з зовнішнього боку мікросхеми замість вбудовування в мікросхему. Температурним датчиком міг би бути будь-який датчик, який може вимірювати температуру. Мікросхема ПЛР з низькотемпературної кераміки (103) взаємодіє з портативним електронним пристроєм (109), що складається з блоку управління, який має елемент управління підігрівачем і схему збудження (102), і управляє роботою підігрівача, виходячи зі значення температурного датчика. Значення температурного датчика передається до елемента управління підігрівачем через термочутливу схему (107). Елемент управління підігрівачем установлює температуру мікросхеми і підтримує цю температуру протягом періоду тривалості, що забезпечується мікроконтролером (106), відповідно до встановлених величин. Усі компоненти на портативному пристрої (109) живляться за допомогою портативного батарейного джерела живлення (108).

Портативний пристрій (109) також містить оптичну систему (104) для виявлення флуоресцентних сигналів з мікросхеми ПЛР (103). Вона складається з джерела світла, схеми для управління джерелом світла, детектора для сприймання випроміненого світла зі зразка, схеми для підсилення сигналу (із зразка). Портативний пристрій (109) буде взаємодіяти з іншим процесорним пристроєм (101) таким, як USB/Блутус - смартфон/ ПЦА або будь-яким іншим процесорним пристроєм, призначеним для збору та контролю даних.

Батареями можуть бути батарея з вільним доступом до неї, що має порт для самостійної підзарядки від зовнішніх джерел живлення. Наприклад, це може бути нікель-кадмієва батарея, іонно-літієва батарея або ж полімерна батарея, що може забезпечити максимальний струм, більше 1 А.

Цей портативний пристрій має також, принаймні, один комунікаційний інтерфейс (107) для взаємодії з іншими пристроями (101). Комунікаційний інтерфейс (107) може бути проводимим (послідовний порт RS232, USB) або безпроводим (Блутус, що виконує профіль послідовного порту). Типово профіль послідовного порту використовується в цілях комунікації завдяки своїй швидкості та легкості в експлуатації. Інтерфейс передає дані та інструкції до іншого пристрою (101) та мікроконтролера (106).

Під іншими пристроями (101) тут розуміються ті пристрої, що можуть здійснювати контроль та моніторинг цього портативного пристрою. Наприклад, іншим пристроєм міг би бути ПЦА, смартфон, комп'ютер, мікроконтролер або будь-який інший процесорний пристрій, що може обмінюватися інформацією з портативним пристроєм. Інший пристрій, який згадується в цьому документі, також забезпечує інтерфейс користувача для виводу і перегляду даних користувачем. Інший пристрій, що згадується тут, має здатність працювати на базі відповідного програмного забезпечення з метою обміну інформацією, контролю та моніторингу цього портативного пристрою (109).

Мікроконтролер (106) управляє електронікою на цьому портативному пристрої (109) і обмінюється інформацією з іншим пристроєм (101) за допомогою інтерфейсу. Мікроконтролер має аналогово-цифровий та цифрово-аналоговий конвертер для взаємодії з аналоговою схемою тобто схемою управління (102), термочутливою схемою (107) і оптичною схемою (105). Мікроконтролер (106) збирає значення встановлених величин з іншого пристрою і передає їх до схеми управління (102). Мікроконтролер також передає значення температури, зчитані термочутливою схемою, (107) та оптичні дані, отримані оптичною схемою (105) до іншого пристрою. Під оптичними даними тут розуміється сигнал, виявлений оптичною системою (105).

Рисунок 2 демонструє ортогональну проекцію виконання мікросхеми ПЛР з зазначенням реакційної камери (201) чи комірки. На цьому рисунку зазначено скомпонований блок підігрівача (201) і температурний датчик - терморезистор (203) в середині мікросхеми ПЛР з низькотемпературної кераміки. Також зазначені лінії провідника підігрівача (205) та лінії провідника терморезистора (204). Ці лінії провідника допоможуть в забезпеченні зв'язку підігрівача та терморезистора, вбудованих в бокову поверхню, з зовнішньою схемою.

Посилаючись на рисунок 3, на якому показано поперечний профіль виконання мікросхеми ПЛР з низькотемпературної кераміки, де (206a і 206b) позначають контактні майданчики для підігрівача (202), а (207a і 207b) позначають контактний майданчик для терморезистора (203).

Посилаючись на Рисунок 4, 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 (401), три середні шари, які мають нагрівальний шар (402), провідниковий шар (403) та шар, що має терморезистор (404), в той час як шар (405) формує шар стикування з реакційною камерою (201). Шари реакційної камери (406) складаються з шести шарів, як це показано. Провідниковий шар (403) також вставляється між нагрівальним шаром і шаром терморезистора. Провідникова лінія підігрівача (205) та провідникові лінії терморезистора (204) також позначені. На рисунку показано, що лінії провідника (204) розміщені з іншого боку шару терморезистора (404). 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.

Мікросхема з низькотемпературної кераміки має достатній об'єм від 1 до 25  $\mu\text{л}$ . 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.

Після встановлення узгодженості температурного профілю в межах мікросхеми, були виконані полімеразні ланцюгові реакції на цих мікросхемах. Успішно були збільшені фрагменти ДНК лямбди, ДНК сальмонели та ДНК гепатиту В з використанням цих мікросхем. Рисунок 5 демонструє тривимірний вигляд мікросхеми із позначенням різноманітних з'єднань з підігрівачем, провідниковими кільцями, терморезистором і провідниковими кільцями (502). На ньому також показані клеми (501), за допомогою яких приєднуються провідникові кільця (502) до пластини провідника (403).

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 A6) або Haraeus. 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.

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

Оптична система детектування (104,105)

Оптична (флуоресцентна) система детектування складається з джерела освітлення, типового світлодіода, фільтрів для відбору світла з відповідною довжиною хвилі, оптичного інструменту для подачі та збору світла зі зразка та світлочутливого датчика (фотодіода, фотоелектронного помножувач, фототранзистору, датчика зображення, тощо). До її складу також входить електрична схема (105) для управління джерелом світла, виявлення сигналу зі світлочутливого датчика. В портативних застосуваннях перевага надається фотодіоду чи фототранзистору або ж датчику зображення з причини низького енергоспоживання (<1мВт). Для здійснення процесу виявлення продуктів ПЛР в режимі реального часу застосовується флуоресцентна техніка, в межах якої фоточутливий барвник (флуорофор, наприклад зелений SYBR Green), що наявний в суміші ПЛР, поглинає світло з певною довжиною хвилі та виділяє більшу довжину хвилі (470нм і 520нм для SYBR Green). Типово інтенсивність виділеного світла поступово збільшується чи зменшується по мірі успішного протікання ПЛР. Завдяки моніторингу інтенсивності виділеного світла передається здатність детектування в режимі реального часу пристрою ПЛР. Скупчення та збір світла зі зразка ПЛР можна досягнути багатьма способами. Методи, зазначені нижче, можуть застосовуватися в системі

- Розгалужена оптична система детектування, в якій використовується розгалужене оптичне волокно (605) (багатомодовий пластик або кварцове волокно чи волоконно-оптичні джгути), що має розгалужений кінець (605a) та спільний кінець (605b). Один з розгалужених кінців (605a) - для падіння світла із світло діода (601) на зразок, а інший кінець - до падаючого світла на фотодетектор (602). Спільний кінець (605b) направляє світло на зразок. Для цього метода застосовується оптичний інструмент для скупчення світла на і з волокна, на додачу до фільтрів для вибіркової довжини хвилі.

- Оптична система детектування з світлорозділювачем використовує світлорозділювачі, лінзи і фільтри для фокусування світла на зразок та детектування. Рисунок 19

- Комбінована оптична система детектування використовує оптичне волокно для освітлення, а для безпосереднього виявлення застосовуються фокусні лінзи, фільтр і детектор. Рисунок 20

Рисунок 6 демонструє виконання оптичної системи, яка має перевагу в застосуванні для пристрою ПЛР відповідно до цього винаходу. На цьому рисунку показана конфігурація з розгалуженим оптичним волокном (605), до складу якої входить джерело збудження світлочутливого діода (601) на одному кінці розгалуженого кінця (605a) та флуоресцентний сигнал, виявлений за допомогою фотодетектора (602) на іншому розгалуженому кінці (605a). Світлочутливий діод (601) та фотодетектор (602) приєднуються до розгалуженого кінця (605a) оптичного волокна, а спільний кінець (605b) повернуто в бік реакційної камери (201) мікросхеми з низькотемпературної кераміки (200). На рисунку також показано фільтр (604a), який приєднано до світлочутливого діода (601), та фільтр (604b), приєднаний до фотодетектора (602) за допомогою клем (603a і 603b) відповідно.

Вихідний сигнал із детектора (602) підсилюється (на місці в фотоелектронному помножувачі, лавинному фотодіоді) за допомогою схеми підсилювача (701), як на рисунку 7, перед тим, як надіслати його до елемента управління підігрівачем. Прикладом схеми підсилювача є схема контуру фазової синхронізації (КФС) (синхронний підсилювач). В цій схемі світло пульсує з попередньо встановленою частотою (характерно в діапазоні від 10 Гц до 500 кГц). Схема, що обробляє вихідний сигнал (флуоресцентний сигнал), замикається з тією ж частотою і генерує в рівномірній кількості постійний струм (ПС), що підсилюється, конвертується в напругу, яка в подальшому підсилюється і направляє до мікроконтролера (106). Ця схема збільшує значення сигналу до коефіцієнту шуму цього сигналу і ліквідує шум в сигналі, що пов'язаний з частотою. Схема синхронізації базується на балансовому модуляторі/демодуляторі (наприклад, AD 630 JN від компанії «Analog Devices»).

На рисунку 7 показано просторову діаграму схеми, яка контролює підігрівач і терморезистор, в межах якої терморезистор в мікросхемі ПЛР з низькотемпературної кераміки (200) діє в якості одного з плечей мостової схеми (706). Навіть у випадку, коли температурний датчик розташований з зовнішньої сторони мікросхеми, його можна приєднати до одного з плечей мостової схеми. Підсилений вихідний сигнал мостової схеми з мостового підсилювача (701) подається в якості вхідного сигналу до ПІД-регулятора (703), 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 (704).

Для аналогової схеми, виконаної для елемента управління підігрівачем (703), застосовується пропорційний або пропорційно-диференціальний чи пропорційно-інтегрально-диференціальний (ПІД) контролюючий елемент, або ж простий двопозиційний контролюючий елемент «ввімкнено/вимкнено» на основі вихідного сигналу з терморезистора. Температурний датчик є частиною схеми, що виявляє зміни в температурі. На цьому рисунку приклад терморезистора розуміється як температурний датчик, де зроблено частину врівноваженої мостової схеми (706). Зміна значення опору терморезистора внаслідок підігрівання чи охолодження призводить до кінцевої вихідної напруги зі схеми. Значення цієї напруги пов'язано з величиною температури комірки на мікросхемі з низькотемпературної кераміки. Значення виміряної напруги використовується для визначення того, чи потрібно вмикати, або вимикати підігрівач. До підігрівача подається електроенергія попередньо встановленої величини, що визначається значенням максимальної температури, яка має бути в комірці (на мікросхемі з низькотемпературної кераміки). Враховуючи варіювання опору в підігрівачі і терморезисторі (~20% для оптимізованої мікросхеми), було розроблено схему самокалібрування, і виконано в портативному варіанті. За допомогою цієї схеми компенсуються зміни в опорі з використанням промислового терморезистора (PT100), що зазнає впливу оточуючого середовища.

Схема управління підігрівачем керується за допомогою мікроконтролера. Цей мікроконтролер запрограмовано таким чином, щоби виконувати бажаний температурний профіль через комунікаційний інтерфейс. Ця програма здійснює управління схемою управління підігрівача (102) з метою виконання бажаного профілю на мікросхемі з низькотемпературної кераміки. З метою управління мікроконтролером було протестовано інтерфейс Блутуса з використанням програмного забезпечення, яке працює на ПЦА (iPac, що працює з програмним забезпеченням WincowsCE). Розробка програмного забезпечення для здійснення комунікації через Блутус та розробка ГПС (Графічного Інтерфейсу Користувача) виконується в цьому портативному пристрої (109). 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 обмеження. Інші засоби та методи управління роботою підігрівача й зчитування значень терморезистора є достатньо прийнятні для застосування на думку сторони, яка оприлюднює цю інформацію.

Інший пристрій дає можливість користувачам створювати температурні профілі для ПЛР за допомогою ГІК (Графічного Інтерфейсу Користувача). Температурні профілі передаються до мікроконтролера за допомогою інтерфейсу (107). Тепловий профіль складається з встановлених величин (Температури та часу), а також кількості циклів. Дані температурного датчика та дані оптичного детектування, отримані з мікроконтролера, направляються до іншого пристрою і виводяться на його дисплеї. Комп'ютер також виконає оцінювання даних і виведе на дисплей результат реакції. Цей портативний комп'ютер працює на такій операційній системі, як Windows CE/Mobile, Palm OS, Symbian, Linux. А ще в одному виконанні можливо здійснювати направлення виключно встановлених величин до цього портативного пристрою, при цьому моніторинг кількості циклів проводиться іншим пристроєм. Мікроконтролер досягає встановлених величин, надісланих з температурного профілю за допомогою іншого пристрою.

Як правило, результат ПЛР аналізується з використанням гель-електрофорезу. Відповідно до цієї техніки фрагменти ДНК після 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.

Приклад, наведений нижче, пояснює різні можливості, які можна досягнути, використовуючи цей портативний пристрій (109) з іншим пристроєм. Під іншим пристроєм в цьому прикладі мається на увазі ПЦА/Смартфон.

Цільова прикладна програма ПЦА/Смартфона працює на операційній платформі Windows mobile 5 platform. Для неї використовується мобільний стек windows Блутус для профілю

послідовного порту (SPP) для обміну інформацією з цим портативним пристроєм. Цей портативний пристрій складається з модуля Блутус, який здійснює обмін інформацією з мікроконтролером через порт УАПП (Універсального Асинхронного Приймача-передавача) для обміну даними. Основна функціональність цієї прикладної програми полягає в здійсненні контролю та моніторингу процесу циклічного температурного впливу цього портативного пристрою, незалежно від різноманітних збережених температурних профілів. До її функцій також належить здійснення управління дворівневим доступом; побудова графіку за даними, створення температурних профілів, тощо. Рисунок 15 демонструє метод комунікації між прикладною програмою і цим портативним пристроєм.

#### Прикладна програма ПЦА

Прикладна програма ПЦА приймає вхідні дані, які містять встановлені величини (температуру і час), а також кількість циклів. Значення встановлених величин передаються до цього портативного пристрою за допомогою з'єднання Блутус, а потім очікується відповідь від портативного пристрою. Отримавши значення встановлених величин, портативний пристрій обмінюється тією ж інформацією з ПЦА, який направляє наступний набір вказівок (рисунок 17). ПЦА також отримує дані з портативного пристрою (значення температури та оптичні дані) і виводить їх на дисплей. Для обміну інформацією та виконання вказівок, направлених ПЦА, портативний пристрій має мікроконтролер з вбудованою програмою, яка дозволяє здійснювати обмін інформацією за допомогою Блутус і управління аналоговими схемами. До того ж, програма на мікроконтролері безперервно направляє значення температури та оптичні дані до ПЦА. Прикладна програма ПЦА має 4 модулі:

##### 1. Управління доступом

##### 2. ГІК

##### 3. Обробка даних і обмін інформацією

##### Управління доступом:

1. Цей модуль дозволяє користувачам зайти в прикладну програму.

2. Він має екран реєстрації з ім'ям і паролем користувача.

3. Існує два рівні управління доступом а. Адміністративний б. Рівень користувача

4. Адміністратор має такі повноваження:

а. Створювати користувачів і папки користувачів

б. Створювати температурні профілі

с. Приєднувати/змінювати портативний пристрій (109)

5. Користувачі, зареєструвавшись раз в системі під своїм Іменем і Паролем, мають повноваження виконувати прикладну програму, переглядати та зберігати дані, що стосуються їх сеансу.

##### ГІК

1. Модуль ГІК забезпечує екрани для :

а. Адміністраторів для введення різних заданих значень (Температури та часу) і створення/видалення/зміни температурних профілів.

б. Створення/видалення Користувачів і папок Користувачів.

с. Заміни портативного пристрою.

і. Прикладна програма використовує стек Блутус для виявлення в діапазоні пристроїв з Блутус. Після виявлення вона виводить на дисплей всі наявні в діапазоні пристрої. Адміністратор вибирає портативний пристрій, а прикладна програма видасть запит на наявність стеку Блутус для з'єднання з портативним пристроєм (109). Після з'єднання вона зберігає інформацію про пристрій, з яким відбулося з'єднання, для використання її в подальшому.

д. Запуску, зупинки, повторного запуску та тимчасової зупинки роботи прикладної програми.

е. Вікна реєстрації, яке відображає дані, передані та отримані за допомогою прикладної програми.

2. Модуль ГПС має екран для побудови графіку на основі температурних і оптичних даних, зібраних з портативного пристрою.

##### Модуль обробки даних

Модуль обробки даних виконує такі функції:

##### 1. Конвертація даних

2. Алгоритм обміну інформацією. Конвертація даних:

1. Дані збираються з температурного профілю, вибраного користувачем.

2. Нижче наведені дані є характерним температурним профілем: Початкове Задане значення

Задане значення 1  
Задане значення 2 } Кількість циклів  
Задане значення 3

Кінцеве задане значення

3. Оскільки задане значення містить температуру і час, значення температури в  
5 подальшому конвертують в значення напруги, використовуючи формулу:

$$V = \frac{t - x}{y}$$

Де V - це напруга, а t - це температура, x та y - попередньо встановлені константи.

4. Таким чином отримані значення напруги будуть конвертовані в 10-бітні шістнадцяткові  
(основа - 16) значення, використовуючи формулу:

$$\frac{V}{V_{\text{жмивлення}}} * 1023, \text{ де } V - \text{це напруга.}$$

10

5. Значення часу (в секундах) конвертуються в шістнадцяткові значення.

6. Температурні дані, зібрані з портативного пристрою, будуть конвертовані з  
шістнадцяткових значень в напругу для побудови графіка, використовуючи цю формулу:

$$\frac{Hex}{1023} * V_{\text{жмивлення}}$$

15

7. Напруга повторно конвертується назад в температуру:

$$t = V * y + x$$

8. Зібрані оптичні дані будуть конвертовані в напругу і направлені безпосередньо для  
побудови графіка,

Обмін даними:

20

- Модуль обміну даними веде спілкування зі мобільним стеком windows блутус. Під час обміну  
інформацією з'являються такі протоколи.

Запуск:

25

- Кнопка запуску, передбачена прикладною програмою, запускає процес циклічного теплового  
впливу. Прикладна програма видає запит щодо наявності стеку Блутус для встановлення  
зв'язку через безпроводний послідовний порт з портативним пристроєм. Після підтвердження  
отримання ПЦА починає обмін інформацією з портативним пристроєм.

Стоп/Пауза/Продовжити

30

- Команда Стоп зупинить процес циклічного теплового впливу та дасть вказівку портативному  
пристрою знизити температуру мікросхеми до кімнатної температури - цей процес не можна  
запустити повторно. Команда «Пауза» буде підтримувати температуру мікросхеми на рівні  
поточної робочої температури. Цю команду можна відмінити командою «Продовжити».

35

- Завдяки використанню портативної обчислювальної платформи такої, як ПЦА, система  
отримує достатню продуктивність комп'ютера для управління електронікою та забезпечує  
багатий і водночас простий інтерфейс користувача для виведення даних на дисплей. Це також  
робить всю систему модульною, а відтак дає можливість легко здійснити модернізацію системи  
з мінімальними витратами для користувача.

40

- Цей винахід забезпечує ринковий портативний ПЛР пристрій для спеціального  
діагностування. Програма, що працює на іншому пристрої, забезпечує повну портативну  
систему для ПЛР з можливістю детектування в режимі реального часу та управління за  
допомогою програмного забезпечення.

45

- 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  $\mu\text{л}$ , було скорочено менше, ніж до  
30 хвилин. Рисунок 14 демонструє час, що займає процес збільшення ДНК вірусу Гепатиту В з  
використанням мікросхеми з низькотемпературної кераміки, представленій цим винаходом. ПЛР  
проходила 45 циклів і могла досягнути процесу збільшення впродовж 45 хвилин, як це  
зазначено в точці (1) Рисунку 14. В подальшому процес збільшення спостерігався, коли ПЛР  
проходила 45 циклів через 20 хвилин (2), а також 15 хвилин (3). 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 мікомасштабі. 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 (Рисунок 12), СНІД, туберкульоз, тощо. До інших ринків збуту належить ринок моніторингу якості харчових продуктів, аналіз ДНК, криміналістика та моніторинг стану оточуючого середовища.

Рисунок 8 демонструє порівняльний графік плавлення фрагменту ДНК  $\lambda$ -636 на мікросхемі з використанням інтегрованого підігрівача і терморезистора.

Рисунок 9 демонструє збільшення інтенсивності флуоресцентного сигналу, що пов'язано зі збільшенням ДНК  $\lambda$ -311. Температурний профіль контролювався портативним пристроєм, а реакція виконувалася на мікросхемі (реакційна суміш, об'ємом в 3  $\mu$ л, та мастило, об'ємом в 6  $\mu$ 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  $\sim 300$  - 400 пар нуклеотидів з кишкової палички і сальмонели, в той час як праймери для фрагменту гена *stn*, збільшеного на  $\sim 200$  пар нуклеотидів з *Salmonella typhi*. Отримані продукти було підтверджено шляхом детектування зеленого світіння фарбника SYBR, а також за допомогою електрофорезу в агарозному гелі. Рисунки 9 та 13 демонструють зображення желеподібної структури збільшеної ДНК  $\lambda$ -311 та гену сальмонели з використанням мікросхеми.

Температурний профіль для збільшення ДНК  $\lambda$ -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  $\sim 200$  пар нуклеотидів з *Salmonella typhi* (рисунок 10). На рисунку 10 з зображенням гель-електрофорезу показано

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

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. Рисунки 11 і 12), використовуючи мікросхему з низькотемпературної кераміки цього винаходу. На рисунку 11 зображення гел'-електрофорезу показує

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

На рисунку 12 зображення гел'-електрофорезу показує

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

5. контрольна реакція

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

Рисунок 16 демонструє криву плавлення, побудовану для похідної величини флуоресцентного сигналу для плавлення ДНК  $\lambda$ -311 на мікросхемі з низькотемпературної кераміки. На цьому рисунку також проводиться порівняння поточного винаходу (161) та традиційного пристрою ПЛР (162).

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

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.

Рисунок 19 демонструє опис виконання оптичної системи зі світлорозділювачем, що можна було би адаптувати для портативного пристрою. Система виявлення світіння складається з джерела світла світлодіода (193), лінзи (196) для фокусування світла, фільтра смужки пропускання (195) для відбору світла певної довжини хвилі, світлорозділювача (191), лінзи (198) для фокусування променя світла, що падає, та сигналу зі зразка, завантаженого на мікросхему (200), фільтра смужки пропускання (194) для відбору світла певної довжини хвилі, фокусної лінзи (197) та фотодетектора (192).

Рисунок 20 демонструє опис виконання комбінованої оптичної системи, що вміщує оптичне волокно та лінзи. Ця система виявлення світіння складається з джерела світла світлодіода, яке не показано на цьому рисунку, фільтра смужки пропускання для відбору світла певної довжини хвилі, який приєднано до оптичного волокна (213). Оптичне волокно направляє світло на зразок. Для фокусування на зразок світла, яке виходить з оптичного волокна, можна використовувати підходящу лінзу на вибір. Лінзи (212) використовуються для того, щоб зачорнити промінь світла, випущений зі зразка, який завантажений на мікросхему (200). Фільтр смужки пропускання (214) для відбору випущеного світла певної довжини хвилі та фокусна лінза (212) для фокусування його на фотодетектор.

## ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Портативний мікропристрій для ПЛР, що складається з:

- a) низькотемпературного керамічного ПЛР-мікрочипа, який складається з нагрівача та реакційної камери для завантаження зразка,
- b) регулятора нагрівача для регулювання нагрівача на основі даних, що отримані від температурного датчика,
- c) оптичної системи виявлення флуоресцентного сигналу від зразка, та
- d) щонайменше одного інтерфейсу зв'язку для взаємодії з іншим пристроєм (пристроями).

2. Пристрій за пунктом 1, в якому є щонайменше один провідний шар між нагрівачем та реакційною камерою.

3. Пристрій за пунктом 1, в якому реакційна камера оточена дрововими кільцями.

4. Пристрій за пунктом 3, в якому дровові кільця стержнями з'єднані з провідним шаром.

5. Пристрій за пунктом 1, в якому температурний датчик знаходиться ззовні чипа або поміщений в щонайменше один шар чипа для вимірювання температури чипа.

6. Пристрій за пунктом 1, в якому температурний датчик під'єднаний у вигляді плеча мостової схеми, дані якого посилюються перед подачею до регулятора нагрівача з метою регулювання роботи нагрівача.

7. Пристрій за пунктом 1, в якому чип складається з прозорого ущільнюючого ковпачка, який закриває реакційну камеру.

8. Пристрій за пунктом 1, в якому оптична система складається з джерела світла та фотодетектора, і таку оптичну систему виявлення вибирають з групи, яка складається з променерозсіплювальної оптичної системи виявлення, гібридної оптичної системи виявлення та роздвоєної оптичної системи виявлення.

9. Пристрій за пунктом 1, в якому інтерфейс зв'язку вибирається з групи, яка складається з serial, USB-порту, технології Bluetooth або їх поєднання.

10. Пристрій за пунктом 1, в якому інший пристрій вибирають з групи, яка складається з смартфона, КПК та програмованого пристрою, на який надходять дані про температуру чипа та посилений сигнал з портативного пристрою.

11. Процес для здійснення моніторингу та контролю за роботою мікропристрою для ПЛР, що складається з таких етапів:

а) встановлення зв'язку між портативним мікропристроєм для ПЛР та іншим пристроєм через інтерфейс зв'язку,

б) запуск процесу термічного циклування на основі значень теплового профілю, отриманих з іншого пристрою, для контролю за роботою низькотемпературного керамічного ПЛР-мікрочипа, та

в) відправлення оптичного сигналу, прийнятого оптичною системою, на інший пристрій.

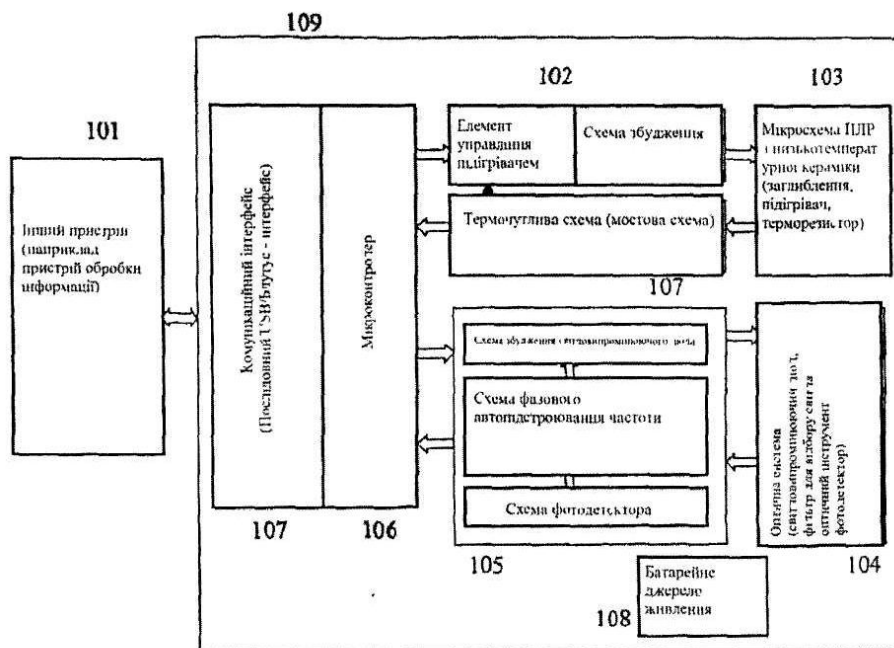
12. Процес за пунктом 11, в якому здійснюється подача значень теплового профілю на інший пристрій, створення, зміна або видалення теплових профілів через інтерфейс користувача.

13. Процес за пунктом 11, в якому інший пристрій забезпечує аутентифікацію користувача і зберігає усі теплові профілі.

14. Процес за пунктом 11, в якому тепловий профіль забезпечує значення заданої величини та кількість циклів, в якому чип утримується при такій температурі та протягом такого часу, які визначені значенням заданої величини.

15. Процес за пунктом 11, в якому температуру ПЛР-мікрочипа доводять до кімнатної температури шляхом зупинки процесу термічного циклування та підтримують постійну температуру ПЛР-мікрочипа під час призупинення термічного циклу.

16. Процес за пунктом 11, в якому термічні та оптичні дані виводять на дисплей іншого пристрою.



Фіг. 1

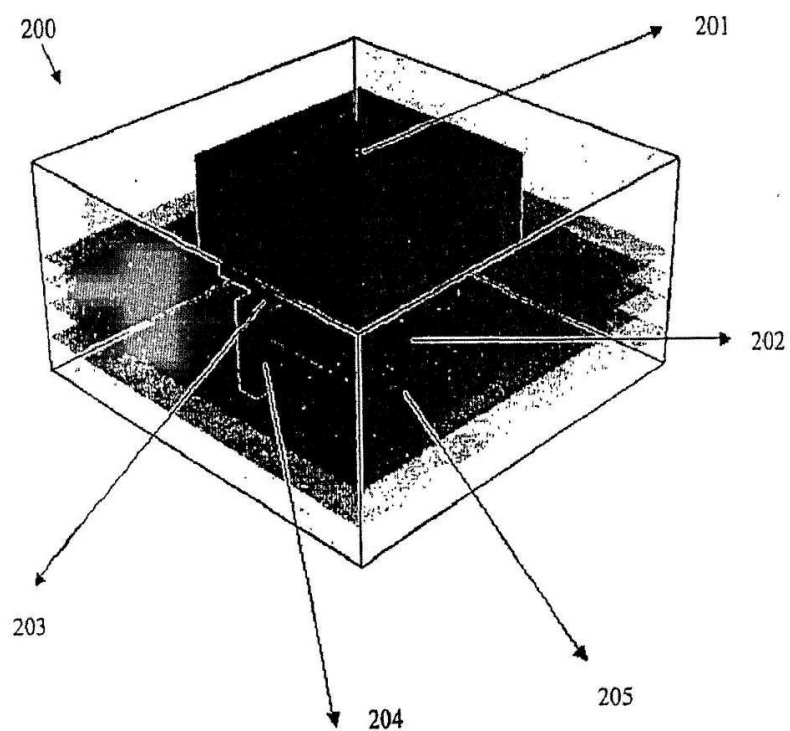


Fig. 2

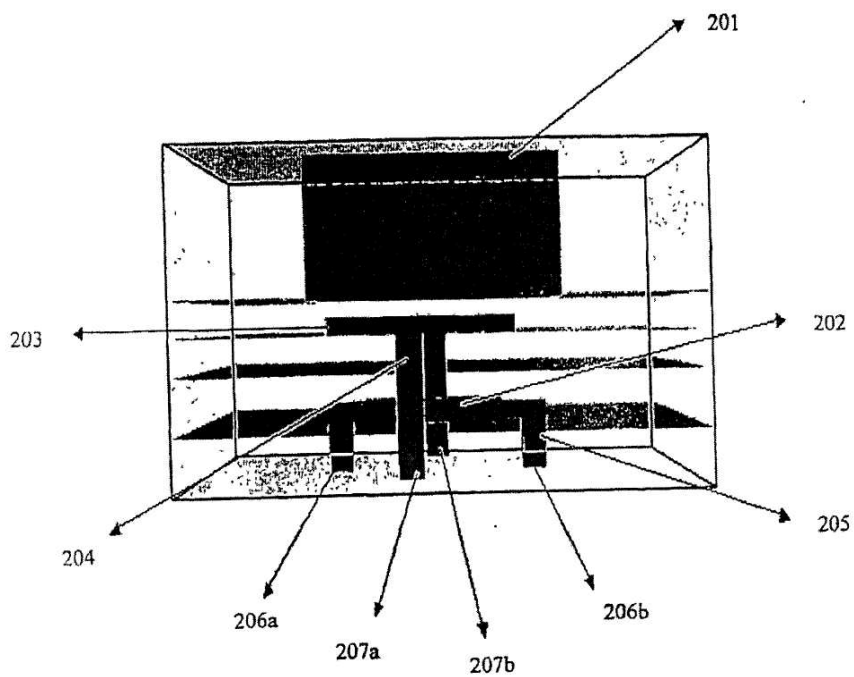


Fig. 3



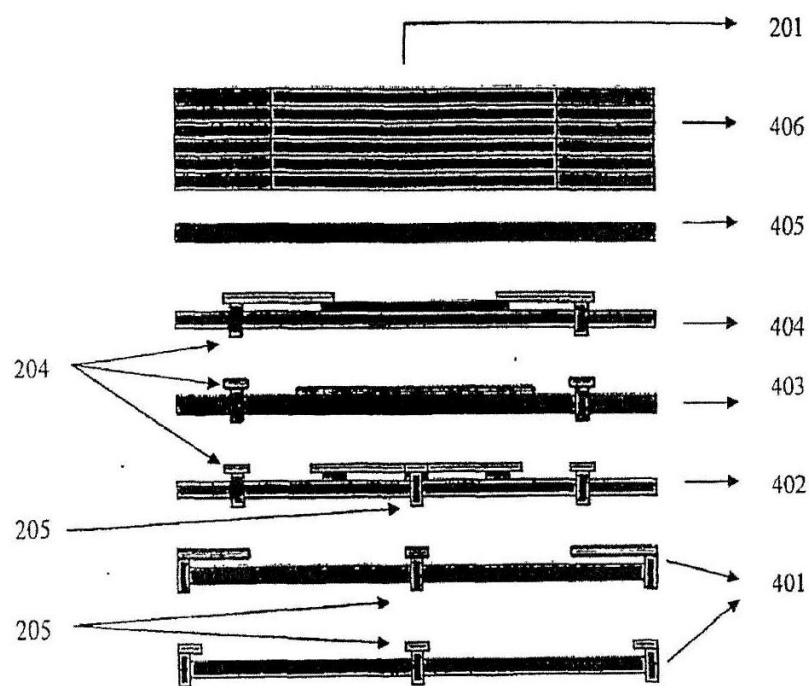


Fig. 4

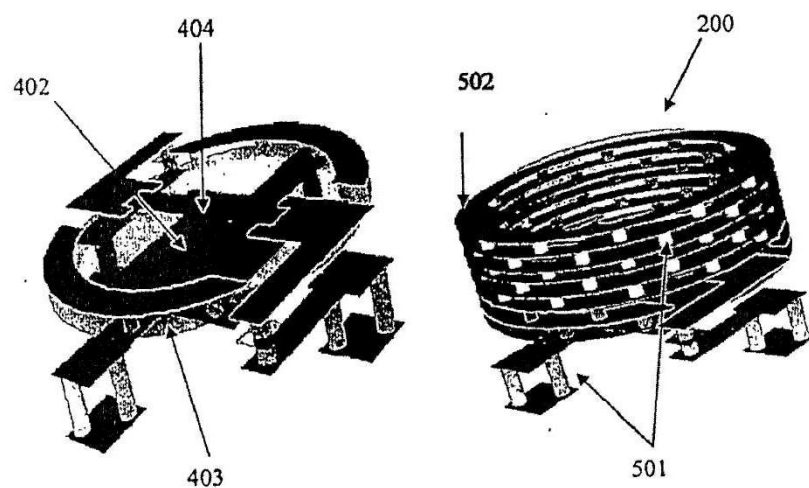


Fig. 5

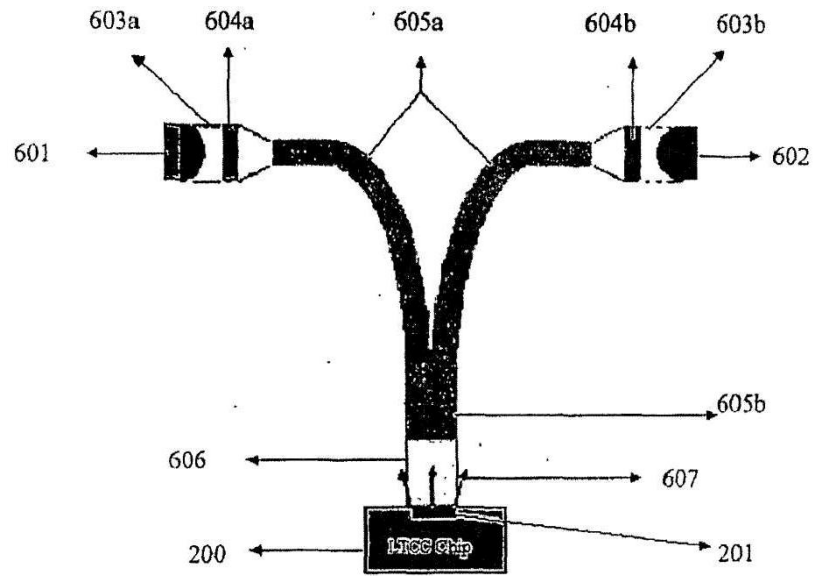


Fig. 6

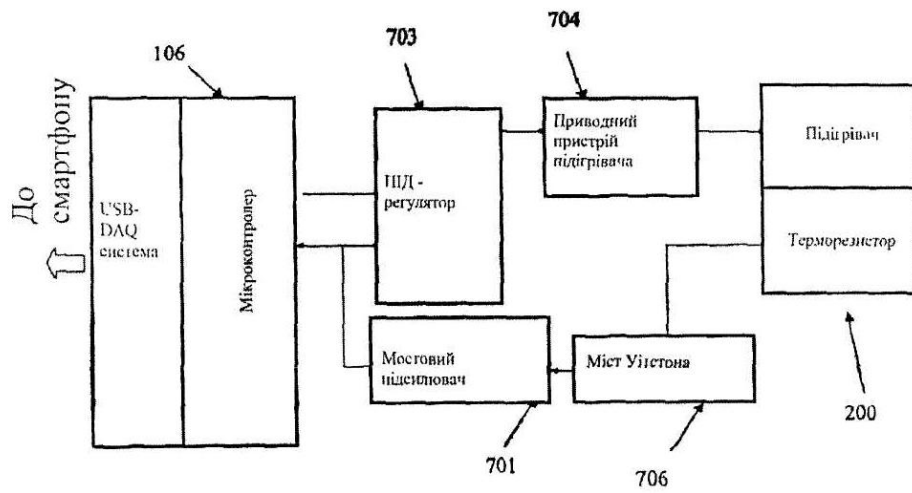
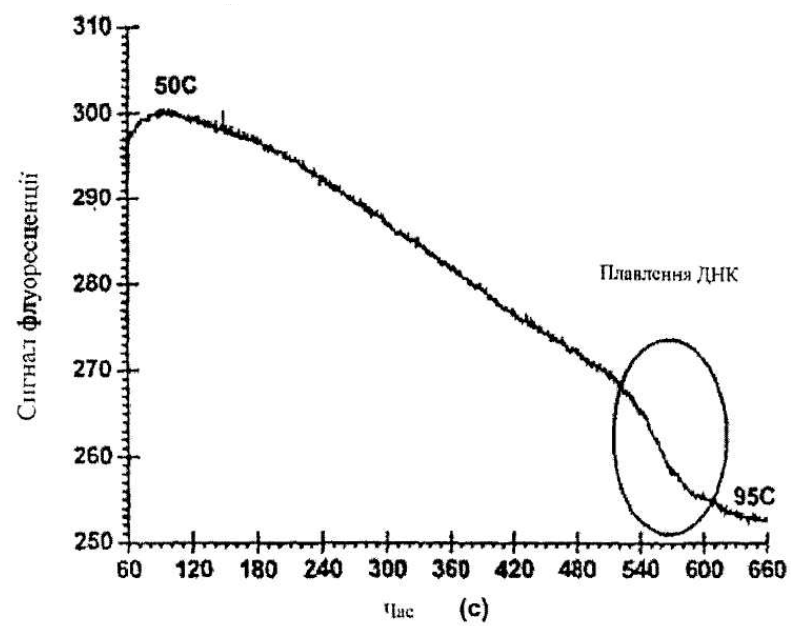
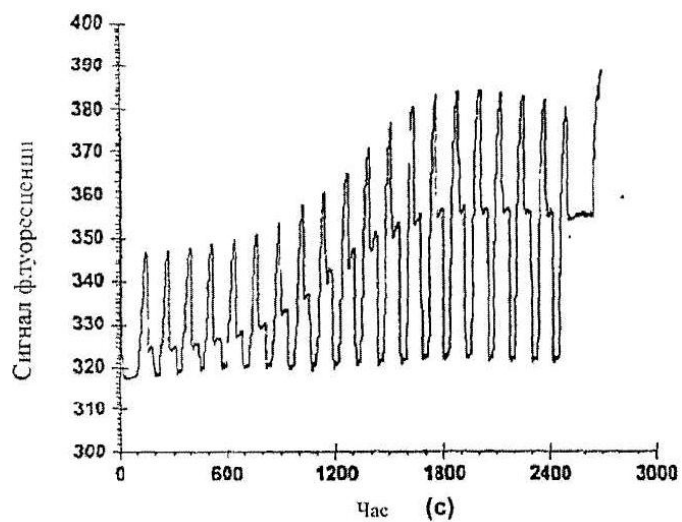


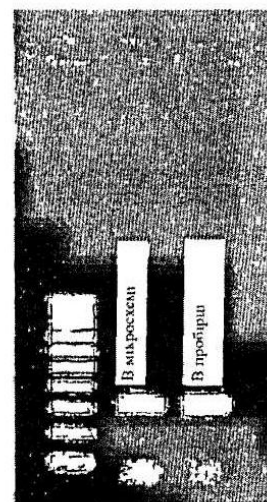
Fig. 7



Фіг.8



(a)



(b)

Фіг.9

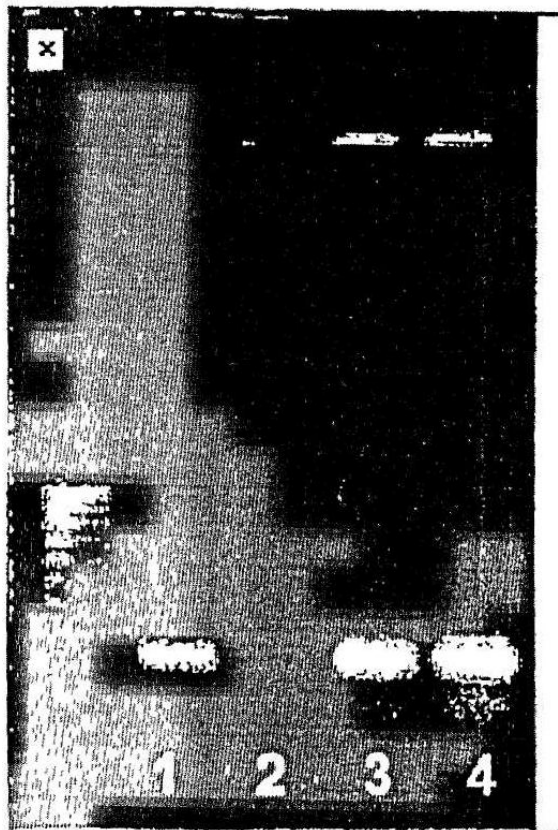


Fig.10

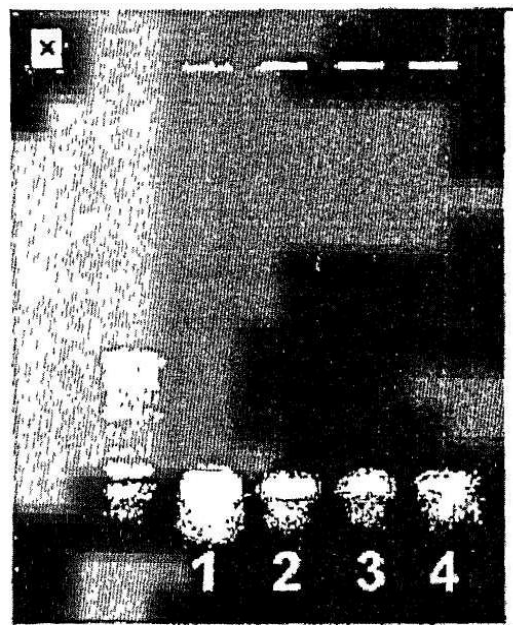
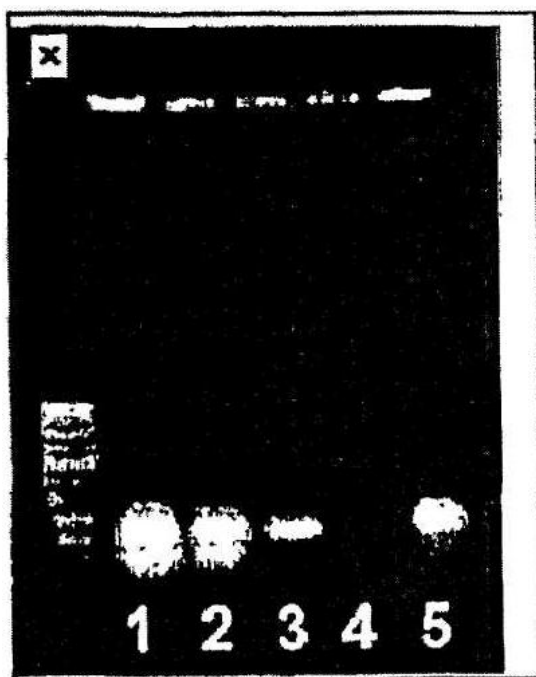
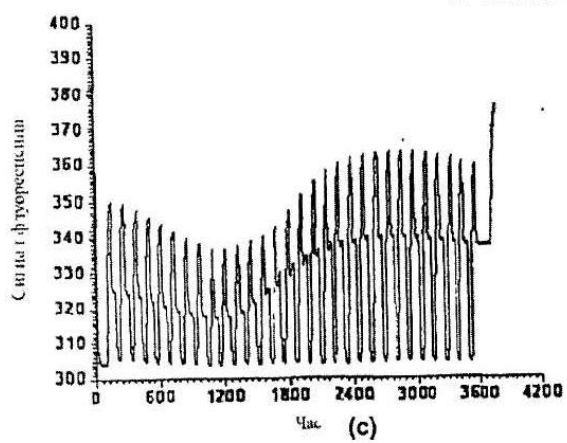


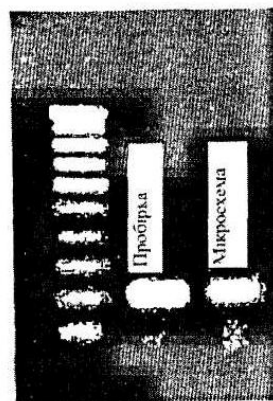
Fig.11

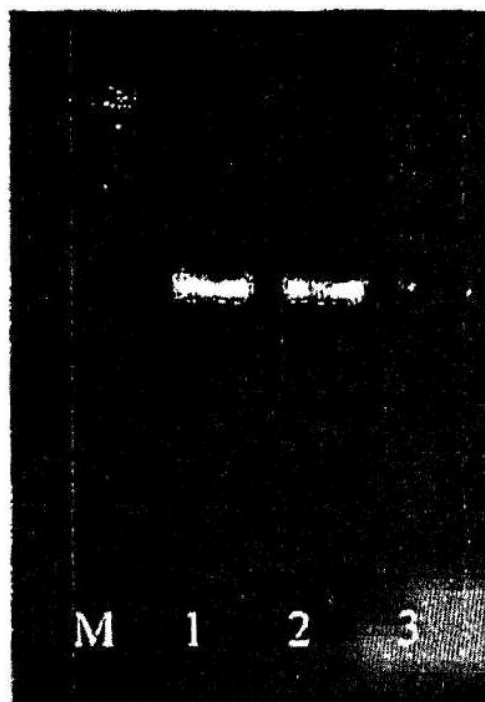


Фіг.12

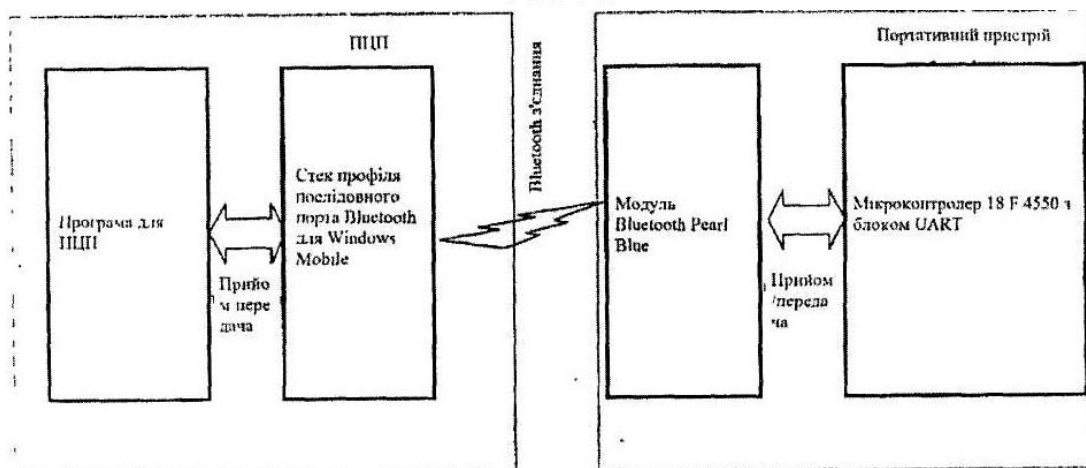


Фіг.13

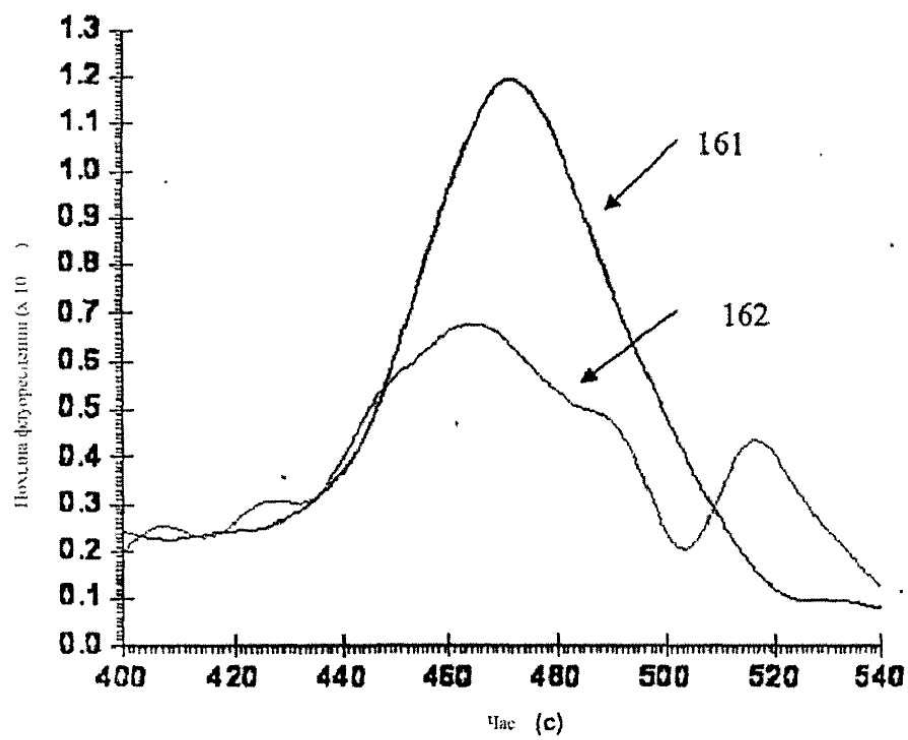




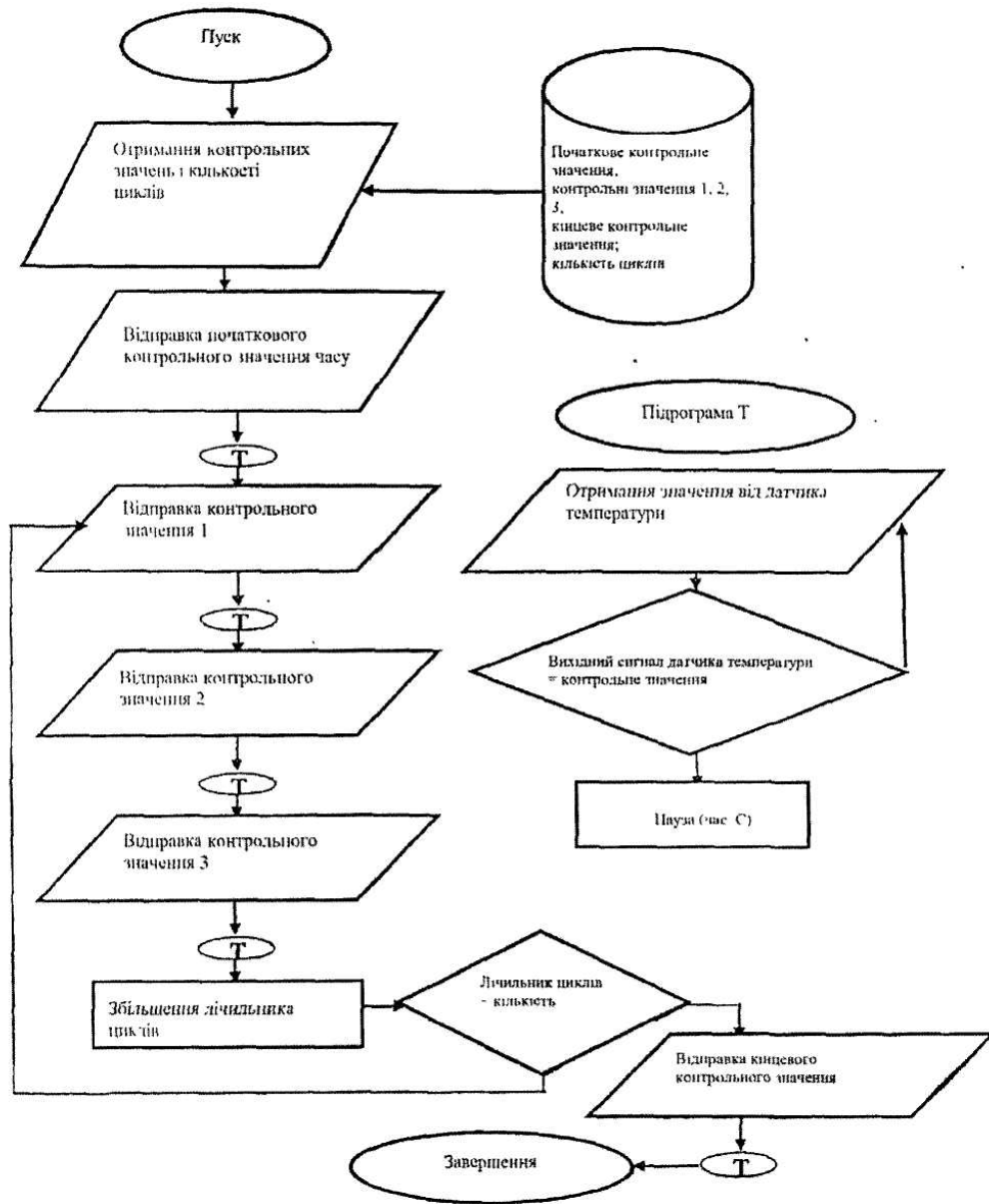
Фіг.14



Фіг.15

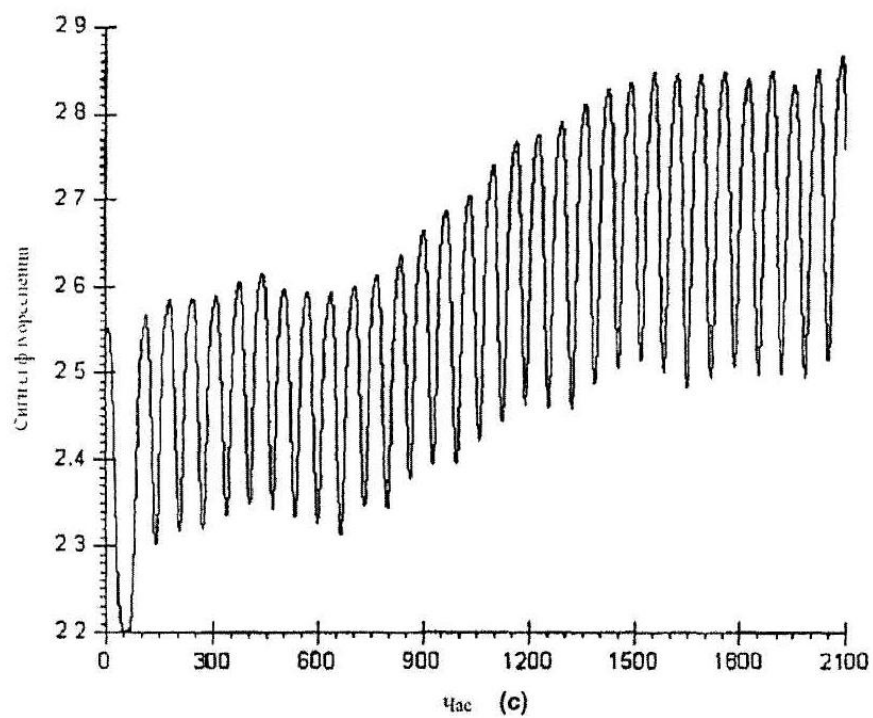


Фіг.16

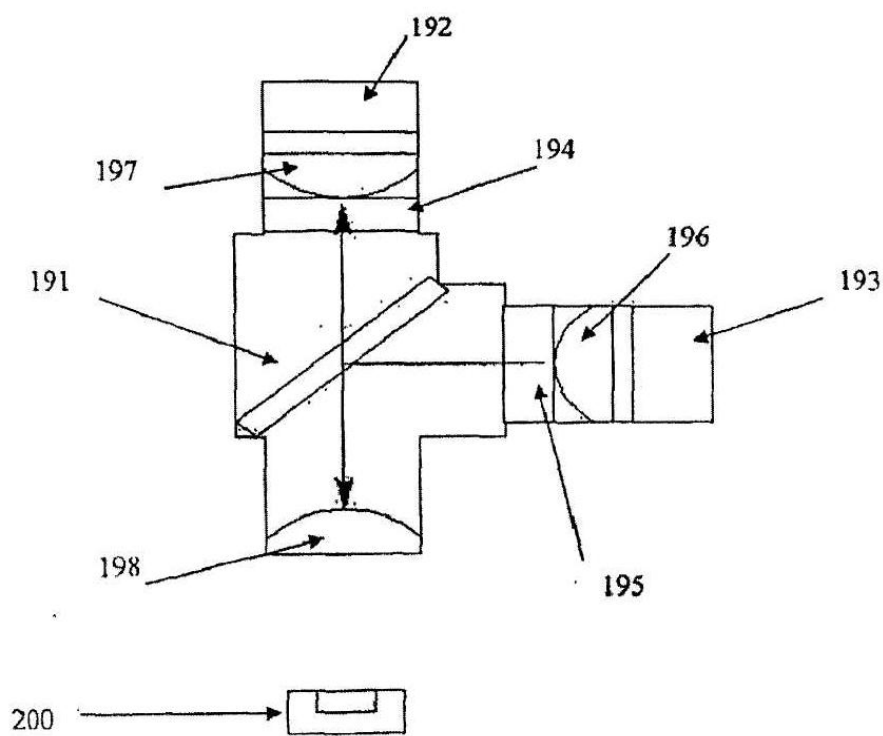


Фіг.17

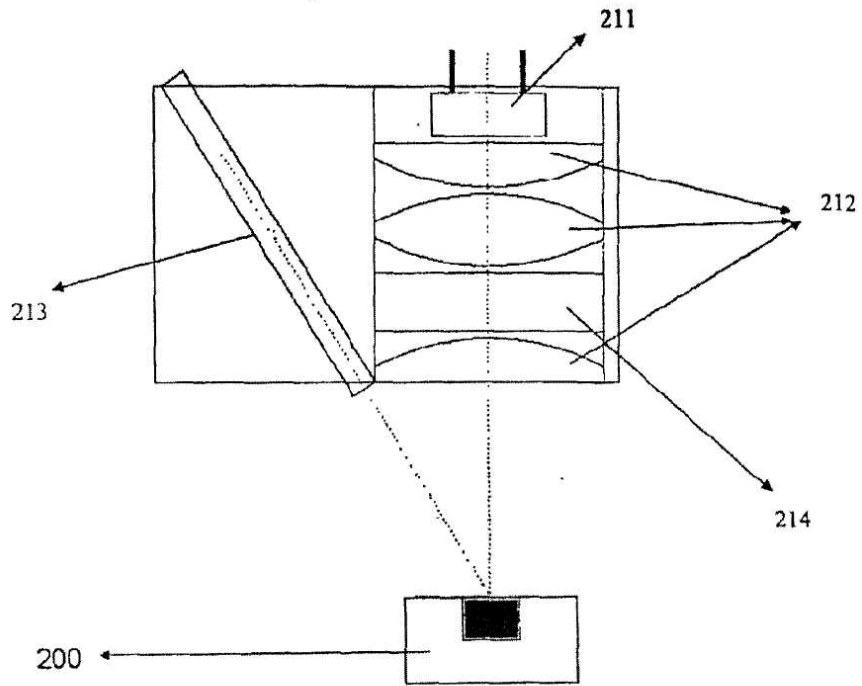




Фиг.18



Фиг.19



Фіг.20

---

Комп'ютерна верстка В. Мацело

---

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