

ÖZET

CİHAZ

Bir numunede bir hedef nükleik asiti saptamaya yönelik bir test gibi bir kimyasal veya biyokimyasal reaksiyonu yürütmeye ve sonuçlarını saptamaya yönelik bir cihaz olup, 5 söz konusu cihaz bir nükleik asit amplifikasyon reaksiyonunu gibi bir kimyasal veya biyokimyasal reaksiyonun bir sıvı fazda gerçekleştirilebileceği bir birinci göz veya bu tür bir birinci göz için bir alma aracı; birinci gözden uzanan bir birinci kanal; isteğe bağlı olarak ikinci göz aracılığıyla söz konusu birinci kanaldan gelen sıvı içeriğini bir emici membranında almak üzere düzenlenmiş bir yanal akış test cihazı içermektedir, burada 10 söz konusu membran bir hedef nükleik asit gibi kimyasal veya biyokimyasal reaksiyonun ürünlerini saptayabilen elemanları içermektedir. Bu tür cihazların kullanımına yönelik yöntemler ve bunları kullanılarak testlerin yürütülmesine yönelik aparat da açıklanmakta ve hak talep edilmektedir.

İSTEMLER

1. Bir numunede bir hedef nükleik asiti saptamak üzere bir testin yürütülmesine yönelik bir cihaz olup, söz konusu cihaz aşağıdakileri içermektedir:

(i) söz konusu hedef nükleik asitin bir nükleik asit amplifikasyon reaksiyonunun gerçekleştirilebileceği bir birinci göz (41);

(ii) söz konusu birinci gözden (41) uzanan bir birinci kanal (44);

(iii) bir yanal akış test cihazı (45) ve

(iv) seyreltici içeren ve birinci göze (41) bir ikinci kanal (46) aracılığıyla bağlanan bir seyreltici gözü (48), burada seyreltici gözü (48) seyrelticiyi içeren bir sızdırmaz esnek kese içermektedir, seyreltici gözü esnek keseye basınç uygulandığında esnek keseyi açacak şekilde düzenlenmiş delme araçları içermektedir;

burada birinci göz (41), seyreltici gözünün (48) hacminden daha az hacimlidir; yanal akış test cihazı (45), söz konusu birinci kanaldan (44) bir emici membranına numune alacak şekilde düzenlenmektedir, burada söz konusu membran söz konusu hedef nükleik asiti saptayabilecek elemanlar içermektedir ve ikinci kanal (46), seyreltici gözünde (48) yer aldığı anda seyrelticiinin birinci göze (41) aktarılabilceği şekilde düzenlenmektedir.

2. İstem 1'e göre bir cihaz olup, burada birinci gözün (41) hacmi 15-50µl'dir ve seyreltici gözünün (48) hacmi 50-250µl'dir.

3. Önceki istemlerden herhangi birine göre bir cihaz olup, ayrıca (iia) birinci kanal (44) aracılığıyla söz konusu birinci göze (41) bağlanan bir ikinci gözü (43) içermektedir, burada birinci kanal (44) söz konusu birinci gözün (41) sıvı içeriğinin ikinci göze (43) aktarılabilceği şekilde düzenlenmektedir ve burada yanal akış test cihazı (45), söz konusu emici membranında söz konusu ikinci gözden (43) sıvı içeriğini alacak şekilde düzenlenmektedir.

4. Önceki istemlerden herhangi birine göre bir cihaz olup, burada birinci göz (41) bir nükleik asit amplifikasyon reaksiyonu gerçekleştirmeye uygun reaktiflerle önceden yüklenmektedir.

5. Önceki istemlerden herhangi birine göre bir cihaz olup, burada birinci göz (41), ikinci göz (43), kanallar (44, 46) ve yanıl akış test cihazı (45) bir mahfaza içinde yer almaktadır.
- 5 6. Önceki istemlerden herhangi birine göre bir cihaz olup, ayrıca sıvı reaktiflerle önceden yüklenmiş olan ve bir kanal aracılığıyla birinci göze (41) bağılı olan, böylece dördüncü gözün içeriğinin birinci göze (41) iletilebildiğı bir kapalı dördüncü gözü içermektedir.
- 10 7. İstem 3-6'dan herhangi birine göre bir cihaz olup, burada bir emici eleman yanıl akış test cihazının (45) ikinci gözü (43) ve bir numune alma bölümü (50) arasında sağlanmaktadır ve ikinci gözden (43) gelen sıvının söz konusu numune alma bölümüne (50) iletilmesine imkân verecek şekilde düzenlenmektedir.
8. Önceki istemlerden herhangi birine göre bir cihaz olup, ayrıca bir nükleik asit ekstraksiyon ve/veya saflaştırma sistemi içermektedir.

TARİFNAME

CİHAZ

Mevcut buluş, biyolojik numuneler gibi numunelerde nükleik asitlerin saptanmasında kullanıma yönelik cihazlarla ilgilidir.

- 5 Numunelerde, özellikle biyolojik numunelerde nükleik asitlerin saptanması, araştırma, tanı, özellikle hastalık ve genetik durumların tanısı, adli tıp ve örneğin bakteriler gibi potansiyel olarak zararlı mikro organizmaların hızla saptanmasının gerektiği hijyen, çevrenin izlenmesi veya askeri amaçlarla mikro organizmaların saptanması alanlarında iyi bilinmektedir.
- 10 Yanal akış cihazları (LFD'ler) hormonlar, antijenler, antikorlar vb. dâhil proteinler gibi hedef analitleri saptamak üzere uzun süredir tanı alanında kullanılmaktadır. Bu cihazlarda, analit içeren veya içerdiği düşünülen bir sıvı numunesi, bir saptanabilir görsel sinyalin numunede analitin varlığına veya yokluğuna bağlı olarak membranda ortaya çıkarıldığı bir sekansta etiketlerle, etiketlenmiş bağlama partnerleriyle ve/veya
- 15 immobilize bağlama partnerleriyle karşılaştığı bir membran boyunca akmaktadır.

Bir numunenin bir LFD boyunca etkili şekilde akmasını sağlamak için gereken sıvı hacmi genellikle oldukça önemlidir. LFD için substrat olarak kullanılan membran gözeneklidir ve genellikle önemli miktarlarda sıvı emecektir. Ayrıca sıvı akışı, etiketlenmiş parçaların cihazdaki saptama bölgesine taşınmasını sağlamaya yeterli

20 olmak zorundadır.

RNA veya DNA gibi nükleik asitleri içeren analitleri saptamak için de kullanılabilmektedirler. Bu durumda analitler için bağlama partnerleri arasında spesifik hedef sekansına hibridize olan oligonükleotidler veya alternatif olarak bir ön amplifikasyon reaksiyonu sırasında RNA veya DNA'ya dâhil edilmiş bağlama ajanlarına

25 yönelik bağlama partnerleri yer alacaktır. Örneğin saptama bölgesinde yakalamayı kolaylaştırmak için biyotin gibi bir bağlama ajanının hedefe dâhil edilmesi amacıyla nükleik asit amplifikasyon reaksiyonları da kullanılabilmektedir. Biyotin bir hedef nükleik asite dâhil edildiğinde, LFD'deki saptama bölgesinde strepavidin veya anti-biyotin antikorlarının varlığı, yakalama bölgesinde biyotin etiketli hedef nükleik asitlerin

30 yakalanmasına yol açacaktır.

Etiketleme, hedef saptama bölgesinde immobilize hale geldiğinde bir görülebilir sinyali üretmek için örneğin hedef sekansa da hibridize olan etiketlenmiş problemlerin kullanılmasıyla ya da etiketlenmiş primerlerin kendiliğinden etiketlenmiş bir ürün üretmek üzere kullanıldığı örneğin bir amplifikasyon reaksiyonu sırasında bir etiketin hedef sekansa dâhil edilmesiyle gerçekleştirilebilmektedir. Uygun etiketler, örneğin floresin veya floresin türevleri dâhil floresan etiketleri veya siyanin boyaları veya digoksinin gibi enzimatik olarak saptanabilecek etiketler gibi kimyasal veya biyokimyasal etiketler alanda iyi bilinmektedir. Bir başka uygulamada, etiketler doğrudan bir görülebilir sinyal üreten altın, gümüş ve lateks boncuklar veya parçacıklar gibi partikülat etiketleri içerebilmektedir. Bunlar saptama bölgesindeki hedef nükleik asitle etkileşime girecek şekilde düzenlenebilmektedirler. Bunun elde edilmesi için bizzat parçacıklar etiketleneceklerdir, örneğin hedef nükleik asitle (örneğin hedef nükleik aside hibridize olan diğer nükleik asitler) etkileşime giren parçacıklara konjuge olacaklardır veya hedef nükleik asit sekansına dâhil edilmiş biyotin gibi bir bağlama partneriyle etkileşime giren streptavidin gibi bir bağlama ajanına konjuge olabilmektedirler.

Nitekim çoğu durumda hedef nükleik asitin bir biyolojik numunede yoğunlaşması düşüktür ve doğrudan bir LFD üzerinde bir görülebilir sinyalin üretilebileceği seviyenin kesinlikle altındadır. Bu nedenle ön adım olarak genellikle nükleik asitin amplifikasyonu gerekmektedir.

Nükleik asit amplifikasyon teknikleri bu alanda güçlü bir araçtır. Bazıları izotermal olarak yürütülen ve bazıları bir numunedeki çok az miktarlardaki hedef nükleik asitin saptanabilir seviyelere amplifiye edilmesine imkân veren polimeraz zincir reaksiyonu gibi termal çevrimi gerektiren pek çok teknik mevcuttur.

Öte yandan bu tekniklerin aşırı hassasiyeti, kontaminasyona veya çapraz kontaminasyona çok eğilimli oldukları anlamına gelmektedir. Çok az bir kontamine edici nükleik asit miktarı bile bu yöntemlerde amplifikasyona maruz kalarak sahte pozitiflere yol açabilmektedir.

Bu sorunun ele alınması için pek çok girişimde bulunulmuştur ve bunlar temel olarak numunenin olabildiğince amplifikasyon sürecinden izole edilmiş bir ortamda işlem görmesini sağlamaya odaklanmaktadır. Bu nedenle bir amplifikasyon reaksiyonu yürütmeye ve reaksiyon kabının açılmak zorunda olmadığı bir homojen reaksiyonda amplifikasyon ürününü saptamaya yönelik yöntemler geliştirilmiştir.

Öte yandan amplifikasyonun devam etmesine imkân vermek için bir biyolojik numunenin sıklıkla örneğin ökaryotik ve prokaryotik hücrelerden veya virüslerden nükleik asitlerin serbest kalması için bazı ön işlem adımlarına tabi tutulması gerekmektedir. Açıkçası bu tür prosedürlerin herhangi bir kontaminasyon riskini en aza indirecek şekilde yürütülmesi istenmektedir.

Örneğin 6,649,378 sayılı ABD patenti, 2004/0110167 sayılı ABD patent yayını ve 2006/0160078 sayılı ABD patent yayını, nükleik asit ekstraksiyonunu, amplifikasyonunu ve saptamasını tek bir cihazda entegre etmiş olan, bir kendine yeten cihazlar yelpazesini açıklamaktadır.

Öte yandan genel olarak bu tür cihazlar, yöntemin gerçekleştirilmesi için fiziksel manipülasyonlara ihtiyaç duymaktadırlar. Örneğin 6,649,378 sayılı ABD patentinin ve 2004/0110167 sayılı ABD patent yayınının cihazları, DNA ekstraksiyonunun bir birinci cihazda gerçekleştirildiği, içeriklerin bir PCR tüpü gibi bir amplifikasyon tüpüne aktarıldığı ve son olarak bir yanıl akış cihazının ("sonuç çubuğu") tüpe sokulduğu sistemleri açıklamaktadır. Bu tür manipülasyonlar kontaminantların bulaşmasına yol açabilmektedir.

2006/0160078 sayılı ABD patent yayınının cihazı, ekstraksiyonun, amplifikasyonun ve saptamanın bir LFD'nin bir membranındaki çeşitli bölgelerde yürütüldüğü bir sistemi açıklamaktadır, burada bölgelerin her biri başta ayrıdır ve ardından bölgeler örneğin aradan geçen bir plastik levhanın çıkarılmasıyla veya bir bölgenin sonraki bölgenin üzerine getirilmesi için bir pistonun kullanılmasıyla art arda bir araya getirilmektedirler. Bu durumda öte yandan her aşamada bulunan sıvı hacimleri bir bakıma LFD'nin membranının gerekliliklerinin ve bunun sıvıyı nasıl emdiğinin veya ilettiğinin bir fonksiyonudur. Öte yandan optimize amplifikasyon reaksiyonları, hacimlerin bir LFD'den akmasının gerektiği 2006/0160078 sayılı ABD patent yayınındaki gibi koşullar altında mümkün olmayabilecek olan, tercihen az hacimlerde 'serbest' sıvıdaki çözeltide yürütülebilmektedir.

WO2004/065010 sayılı belge, DNA'nın izolasyonuna ve amplifikasyonuna ve bir LFD üzerinde saptanmasına yönelik bir mikro akışkansal sistemi açıklamaktadır. WO2009/080817 sayılı belge, nükleik asit analizi için bir hızlı test sistemini açıklamaktadır.

Zahmetli manuel işlemlere gerek kalmadan ve minimum kontaminasyon riskiyle ve maksimum verimlilikle analizin hızlı bir şekilde yapılmasına imkân veren entegre bir sisteme ihtiyaç vardır.

5 Başvuru sahipleri, nükleik asit analizinin, minimum kontaminasyon riskiyle tek kullanımlık olabilecek bir izole edilmiş üniteye yürütülmesine imkân veren bir aparatı geliştirmişlerdir.

Özellikle başvuru sahipleri, bir nükleik asit amplifikasyonunun uygun hacimli bir gözde sıvı fazda gerçekleştirilebileceği ve bu reaksiyonun ürününün çevreye maruz kalmadan bir yanıl akış cihazının bir membranına aktarılacağı bir cihaz tasarlamışlardır.

10 Sonuç olarak mevcut buluş, bir numunede bir hedef nükleik asiti saptamak üzere bir testin yürütülmesine yönelik bir cihazı sağlamakta olup, söz konusu cihaz aşağıdakileri içermektedir:

(i) söz konusu hedef nükleik asitin bir nükleik asit amplifikasyon reaksiyonunun gerçekleştirilebileceği bir birinci göz;

15 (ii) söz konusu birinci gözden uzanan bir birinci kanal;

(iii) bir yanıl akış test cihazı ve

(iv) seyreltici içeren ve birinci göze bir ikinci kanal aracılığıyla bağlanan bir seyreltici gözü, bu seyreltici gözü seyrelticiyi içeren bir sızdırmaz esnek kese içermektedir, seyreltici gözü esnek keseye basınç uygulandığında esnek keseyi
20 açacak şekilde düzenlenmiş delme araçları içermektedir;

burada birinci göz, seyreltici gözü hacminden daha az hacimlidir; yanıl akış test cihazı, söz konusu birinci kanaldan bir emici membranına numune alacak şekilde düzenlenmektedir, burada söz konusu membran söz konusu hedef nükleik asiti saptayabilecek elemanlar içermektedir ve ikinci kanal, seyreltici gözünde yer aldığında
25 seyrelticiinin birinci göze aktarılabilceği şekilde düzenlenmektedir.

Kullanılan hacimlere bağlı olarak birinci kanaldan geçen sıvı doğrudan bir yanıl akış test cihazının bir numune alma bölümüne iletilebilmektedir. Bu bölüm, bir emici ped içerebilmektedir. Öte yandan önemli hacimlerin birinci kanal aracılığıyla iletildiği özel bir uygulamada söz konusu birinci kanaldan sıvı almak üzere düzenlenmiş olan bir ikinci
30 gözün sağlanması elverişli olabilmektedir. Bu durumlarda yanıl akış test cihazı, söz

konusu ikinci gözden numune alacak şekilde düzenlenmektedir. Örneğin yanal akış test cihazının bir alma bölümü, ikinci göze çıkıntı yapabilmektedir. Bu da iletilen hacimlerin, yanal akış cihazının alma bölümü tarafından doğrudan rahatlıkla emilebilecek miktardan daha fazla olduğu durumlarda elverişli olabilmektedir.

- 5 Bu nedenle özel bir uygulamada mevcut buluş, bir numunede bir hedef nükleik asiti saptamak üzere bir testin yürütülmesine yönelik bir cihazı sağlamakta olup, söz konusu cihaz aşağıdakileri içermektedir:

(i) söz konusu hedef nükleik asitin bir nükleik asit amplifikasyon reaksiyonunun sıvı fazda gerçekleştirilebileceği bir birinci göz;

- 10 (iia) bir birinci kanal aracılığıyla söz konusu birinci göze bağlı olan bir ikinci göz, burada birinci kanal, söz konusu birinci gözün içeriğinin ikinci göze aktarılabilceği şekilde düzenlenmektedir;

(iii) söz konusu ikinci gözden numune almak ve içindeki söz konusu hedef nükleik asiti saptamak üzere düzenlenmiş olan bir yanal akış test cihazı.

- 15 Buluşun cihazı, tüm elemanları (i), (ii) ve (iii) ve mevcut olduğunda elemanı (iia) bir entegre üniteye veya varlıkta içeren bir üniter cihaz olabilmektedir. Örneğin cihazın elemanlarının tamamı tek bir mahfazada yer alabilmektedir.

- Burada kullanılan şekliyle “yanal akış test cihazı” terimi, bir emici membran boyunca sıvı akışıyla çalışan herhangi bir test cihazı anlamındadır. Bu nedenle terim, dikey
20 kullanılabilecek geleneksel “daldırma çubuklarını”, ayrıca membran boyunca akışın yatay veya yana doğru meydana geleceği şekilde membranların bir yatay pozisyonda sabitlenmiş olduğu cihazları kapsamaktadır.

- “Kanal” terimi, sıvının örneğin diferansiyel basınç ve/veya yerçekimi etkisiyle serbestçe aktığı ve özellikle kılcal harekete bağlı olmadığı bir katı gövdede tanımlanmış bir yol
25 anlamındadır.

- Sıvının emici akışla aktarıldığı bölümlerin aynı cihaz içerisinde normal sıvı akışına izin verilen bölümlerle birleştirilmesiyle buluşun cihazı testin her aşamasının (amplifikasyon ve saptama) tercih edilen koşullar altında yürütülmesine imkân vermektedir. Bu nedenle birinci gözdeki herhangi bir amplifikasyon reaksiyon karışımının hacmi, optimum
30 amplifikasyon koşullarının sağlanacağı şekilde seçilebilmektedir. Öte yandan bu hacim,

yanal akış test cihazında kullanıma yönelik tercih edilen hacimleri sağlamak üzere seyreltici katılmasıyla ikinci göze ve daha sonra yanal akış cihazına aktarımda artırılabilir. Emici ve normal sıvı akışının bölümleri arasındaki sıvı aktarımı, bölümlerin aynı cihaz içerisinde yer almasıyla kolaylaşmaktadır. Ayrıca cihaz, testin

5 otomatik veya yarı otomatik çalışması için uygundur.

Özel bir uygulamada ikinci göz kapalıdır. Birinci gözü ikinci göze bağlayan birinci kanal cihaz içerisinde, örneğin en az birinci ve ikinci gözleri içeren bir mahfazada uygun şekilde yer almaktadır.

Bir başka uygulamada birinci göz kapanabilir.

10 Burada kullanılan şekliyle “kapalı” terimi, gözlerin, birbiriyle temas halinde olsalar da atmosferden izole edildikleri anlamına gelmektedir. Benzer şekilde “kapanabilir” terimi, örneğin bir kapak, başlık, tıpa veya conta aracılığıyla atmosferden izole edilebilecek bir göz anlamına gelmektedir.

İkinci göz kapalı olduğunda ve birinci kanal da kapalı olduğunda, amplifikasyon reaksiyonları yürütülebilmektedir ve ortaya çıkan amplifikasyon ürünü saptama amacıyla bir yanal akış cihazına atmosfere maruz kalmadan aktarılabilir, böylece kontaminasyon riski en aza indirilmektedir.

15

Cihaz, amplifikasyon reaksiyonu için tercih edilebilir, hatta optimum olan şekilde amplifikasyon reaksiyonunun az hacimli bir sıvıda gerçekleştirilebilmesini sağlamaktadır ve amplifikasyon ürünü, seyreltici katılmasıyla yanal akış cihazı boyunca serbestçe akmasına imkân vermek üzere ikinci göze girmeden önce yeterli şekilde seyreltilebilir. Seyreltici gözü önceden yüklenmiş seyrelticiler içermektedir. Seyreltici, yalnızca kullanım için seyrelticiler gerektiğinde üçüncü gözde açılabilir bir sızdırmaz kap içinde sağlanmaktadır. Bu da sıvı seyreltici, cihazın bozulmasına yol

20 açabilecek şekilde kullanılmadan önce yanal akış cihazının membranına vaktinden önce temas etmesini önlemektedir.

25

Birinci göz özellikle içinde bir nükleik asit amplifikasyon reaksiyonunun yürütülmesine imkân verecek şekilde uyarlanmaktadır. Bu tür reaksiyonlar genellikle göreceli olarak az hacimlerde yürütülmektedirler ve bu nedenle birinci gözün hacmi aşağıda daha ayrıntılı

30 ele alınacağı gibi nispeten az olacaktır.

Öte yandan özellikle birinci göz genellikle bir nükleik asit amplifikasyonunda yürütülen istenen sıcaklıklara ısıtmada kullanılması için uygun şekilde uyarlanmaktadır. Bu nedenle göz, tipik bir nükleik asit amplifikasyon reaksiyonunda görülen bu tür sıcaklıklara ve/veya sıcaklık dalgalanmalarına ve değişikliklerine dayanıklı olan bir malzemedен uygun şekilde yapılmaktadır.

Özel uygulamalarda birinci göz, bir nükleik asit amplifikasyonunu gerçekleştirmek üzere örneğin harici ısıtma cihazlarının veya uygun olan yerlerde ısı döngüleyicilerin kullanılmasıyla ısıtma ve/veya soğutma için kolaylıkla kullanılabilir olması için cihazın bir çıkıntısı veya uzantısı üzerinde düzenlenmektedir.

Özel bir uygulamada birinci göz, mevcut olduğunda ikinci göze ve üçüncü gözlere göre daha az hacme sahiptir. Örneğin birinci gözün 15-50µl gibi 10-250µl arasında, örneğin yaklaşık 25µl'lik bir kapasitesi olabilirken ikinci gözün ve seyreltici gözlerinin uygun şekilde 40-4000µl aralığında, örneğin 40-2500µl kapasiteleri olmaktadır. Özel bir uygulamada ikinci gözün ve seyreltici gözlerinin yaklaşık 2500µl kapasiteleri olabilmektedir. Diğer uygulamalarda gözlerin kapasiteleri 50-250µl gibi 40-1000µl aralığında, örneğin yaklaşık 100µl olabilmektedir. Örneğin birinci gözün çapı yaklaşık 4-10 mm, örneğin yaklaşık 5 mm derinlikle 2-3 mm aralığında olabilirken ikinci gözün ve seyreltici gözlerinin çapı benzer bir derinlikle 7-20 mm aralığında, örneğin yaklaşık 10 mm olabilmektedir.

Bu düzenleme, cihazın reaksiyonun optimum olarak görece az sıvı hacminde gerçekleştirildiği bir dizi kimyasal veya biyokimyasal reaksiyonun yürütülmesine uygun olduğu ve bu hacmin bir geleneksel yanal akış cihazında etkili şekilde bir sinyal sağlamak için gerekenden genellikle daha az olduğu anlamına gelmektedir.

Uygun şekilde yanal akış test cihazı tamamen cihaz içerisinde yer almaktadır, kontaminasyon riskini de en aza indirmek için örneğin cihazın bir mahfazasında yer almaktadır. Bu durumda testin sonuçlarının okunabilmesi için cihazda veya mahfazada uygun şekilde bir gözetleme penceresi sağlanmaktadır veya mahfaza saydam malzemedен yapılmaktadır.

Yanal akış test cihazı, membranın ikinci göze çıkıntı yaptığı ve böylece numuneyi doğrudan ikinci gözden emdiği şekilde düzenlenebilmektedir. Öte yandan özel bir uygulamada bir sıvı akış elemanı, özellikle bir emme elemanı numuneyi ikinci gözden alacağı ve bunu yanal akış cihazının membranının bir numune alma bölümüne

aktaracağı şekilde düzenlenmektedir. Uygun emme elemanları arasında örneğin selüloz veya benzeri gibi bir yoğun, hidrofilik fibröz malzemeden yapılan emici elyaf ped yer almaktadır. Emici eleman bir uçta en azından ikinci göze çıkıntı yapmaktadır ve sıvının ikinci gözden membrana kabul edilebilir ve kontrollü akışını sağlamak için diğer uçta

5 yanıl akış test cihazının membranının bir uç bölgesiyle temas kurmaktadır. Özel bir uygulamada emici eleman, ikinci gözün tabanını belirlemektedir, böylece göze iletilen sıvı doğrudan emici elemana uygulanmaktadır.

Emici eleman bir sinyal ortaya çıkarmak için yanıl akış test cihazında kullanılan reaktifler için bir rezervuar olarak hareket edebilmektedir. Örneğin yukarıda açıklandığı

10 gibi uygun şekilde etiketlenmiş olan amplifiye olmuş hedef nükleik asite yönelik bağlama partnerleri emici eleman içerisinde saklanabilmektedir. Bunlar daha sonra numuneyle birlikte yanıl akış test cihazının membranı boyunca membrandaki uygun saptama bölgesine aktarılmaktadırlar.

Cihaz uygun şekilde bir tek kullanımlık ünitedir. Cihazın en azından bir bölümü ve

15 tercihen tüm cihaz uygun şekilde bir sert plastik malzemeden yapılan bir mahfaza içine uygun şekilde yerleştirilmektedir.

Birinci göz kontrollü şekilde ısıtılabilenkte veya soğutulabilmektedir. Dirençli ısıtma elemanları gibi ısıtma elemanları veya termostat elemanları gibi soğutma elemanları ve ayrıca termistör veya termokupl gibi sıcaklık kontrol veya sıcaklık ölçüm elemanları

20 cihazın kendisine dâhil edilebilmesine rağmen özel bir uygulamada birinci göz, cihazı test amaçları için barındırmak üzere uyarlanmış bir aparatındaki bu elemanlara bitişik, bunlarla temas halinde veya başka bir şekilde bunların içinde olacak şekilde düzenlenmektedir. Cihaz aparata uygun şekilde oturacak şekilde uyarlanmaktadır, böylece birinci göz uygun şekilde kontrollü ısıtma olan ısıtmaya tabi tutulabilmektedir.

Bu nedenle örneğin birinci göz, yukarıda açıklandığı gibi bir çıkıntı üzerinde mahfazanın dışına doğru uzanabilmektedir, böylece isteğe bağlı olarak aparatın parçalarını oluşturan, blok ısıtıcı gibi bir ısıtma veya termo döngüleme elemanı içerisindeki ilgili bir gözün içinde yer alabilmektedir. Alternatif olarak çıkıntı yapan göz, örneğin bir basınçlı hava ısıtıcının, bir termal döngüleyicinin veya bir termostatın hava soğutma veya ısıtma

30 odasına sığacak şekilde düzenlenebilmektedir.

Alternatif olarak cihaz, aparat içerisindeki ısıtma veya termostat elemanlarının, birinci gözün içeriklerinin kontrollü ısıtmasına imkân vermek için, cihaz aparat içerisinde

konumlandırıldığında birinci gözün etrafındaki veya civarındaki cihaza çıkıntı yapacağı şekilde düzenlenmiş oluklar, kanallar veya başka girintiler içerebilmektedir.

Arzu edilirse birinci gözün içeriklerinin seyrelticiyle daha verimli şekilde karıştırılması, cihaz içerisinde bir veya birden fazla ek seyreltici içeren göz sağlanmasıyla gerçekleştirilebilmektedir. Bunlar, birinci gözün içerikleriyle birlikte seyrelticinin ayrı akışlarının da ikinci göze besleneceği şekilde uygun şekilde düzenlenmektedirler. Uygun şekilde akımlar, yanal akış cihazına uygulanmadan önce birinci gözden gelen içeriklerin seyrelticiyle iyileştirilmiş karışımını sağlayan türbülanslı akışı tetiklemek üzere ikinci göze girmeden önce yakınlaşacaktır.

- 10 Birden fazla seyreltici gözünden akış, yararlı karışımı sağlamak üzere uygun şekilde koordine ve kontrol edilmektedir.

Kanallar gerekli transferi kolaylaştıracak şekilde düzenlenecektir. Bu nedenle örneğin birinci kanal, tüm malzemenin uzaklaştırılabilmesi için birinci gözün tabanına bağlanabilmektedir. Birinci kanal, ikinci göze üst bölgesinden girebilmektedir. Benzer şekilde ikinci kanal, üçüncü gözün tabanına bağlanarak birinci gözün bir üst bölgesine bağlanabilmektedir.

- İkinci göz, birinci gözden daha büyük bir kapasiteye sahiptir, böylece birinci göze iletilen seyreltici birinci gözü etkili şekilde geçerek ikinci göze akmaktadır. Böylece birinci gözdeki herhangi bir amplifikasyon ürünü, seyreltilmiş formda ikinci göze iletilebilmektedir.

Genel olarak LFD'nin membranının numune alma bölgesini içeren bir uç bölgesi ikinci gözde yer alacaktır, böylece amplifiye olmuş nükleik asiti içeren sıvı membrana absorbe edilecek ve bunun uzunluğu boyunca emilecektir. Hedef parçacıklara yönelik uygun bağlama partnerlerinin immobilize olduğu bir veya birden fazla saptama veya kontrol bölgesi, geleneksel şekilde söz konusu bir ucun membran aşağı akış yönünde sağlanmaktadır, böylece hedef nükleik asitler (veya başka şekilde bir kompetitif test formatında) söz konusu bölgede yakalanmaktadır. Nükleik asitler ya amplifikasyon reaksiyonu sırasında doğrudan ya da amplifikasyon reaksiyonu sırasında sağlanan veya LFD üzerinde hareketli şekilde yer alan bir etiketlenmiş proba temas yoluyla uygun şekilde etiketlenmektedir. Böylece numune yukarıda açıklandığı gibi partikülât etiketlerle (örn. lateks boncuklarla) ilişkilendirilmiş etiketlenmiş malzemenin bir saptama

bölgesinde birikmesi, LFD'de bir görülebilir sinyale yol açmaktadır. Bu tür cihazların örnekleri örneğin US2004/0110167 sayılı belgede açıklanmaktadır.

Uygun membranlar, selüloz, nitroselüloz veya karboksimetilselüloz; polyesterler, poliamidler, karbonhidrat polimerler gibi sentetik hidrofilik polimerler dâhil olmak üzere hidrofilik polimerler; hidrofobik polimerler, mesela politetrafloroetilen, fiberglas veya gözenekli seramikler gibi halojene edilmiş polimerler gibi selüloz bazlı malzemeler içerebilmektedir.

Özellikle uygun olan membranlar arasında selüloz membranları ve özellikle Millipore'den temin edilebilenler gibi lamineli olabilecek nitroselüloz membranlar yer almaktadır. Bunlar bir polyester (Mylar®) veya PET destekli selüloz membran gibi bir plastik destekli membran gibi bir destekleme malzemesinde desteklenebilmektedir. Bu tür membranların desteği doğal olarak hidrofobiktir, diğer yandan selüloz hidrofiliktir, bu da gereken emme etkisine yol açmaktadır. Öte yandan hidrofilisite, bunlar bir immünoassey prosedürü bağlamında kullanıldıklarında sorunlara yol açabilmektedir.

Gerekirse bu cihazlarda kullanılan membranlar, geleneksel bloke edici ajanlar kullanılarak bloke edilebilmektedir. Bloke edici ajanlar, numunedeki bir protein ile membran arasındaki spesifik olmayan etkileşimleri azaltabilenler veya numunenin emme oranını artırabilenlerdir. Genellikle immobilize edilen bağlama ajanlarının uygulanmasından sonra uygulanmaktadır ve genellikle proteinler, yüzey etken maddeler ve sentetik polimerler dâhil olmak üzere üç tip ajandan seçilmektedirler. Bloke edici ajanlar olarak kullanılabilecek proteinlerin özel örnekleri arasında, kazein gibi yağsız kuru süt bileşenlerinden bovin serum albumin (BSA) yer almaktadır.

Bloke edici ajanlar olarak kullanılabilecek yüzey etken maddelerin örnekleri arasında Tween™ 20 ticari adı altında satılan polioksietilen sorbitan monolaurat ve örneğin Dow şirketi tarafından Triton X™ serisi olarak satılan, örneğin Triton X-100 gibi oktilfenol etoksilatlar gibi iyonik olmayan yüzey etken maddeler yer almaktadır.

Bloke edici reaktifler olarak kullanıma uygun sentetik polimerler arasında polivinil alkol (PVA), polivinilpirrolin (PVP), polietilen glikol (PEG) ve lauril, setil, stearil ve oleil alkollerinden elde edilenler ve Brij™ ticari adı altında satılanlar gibi polioksietilen yağ eterleri yer almaktadır.

Bloke edici reaktifin bu tiplerinden veya sınıflarından ikisinin veya daha fazlasının karışımlarının, örneğin yukarıda belirtildiği gibi bir yüzey etken madde ve bir sentetik polimer içeren bir karışımın özellikle kullanılabileceği genel olarak kabul edilmektedir.

Öte yandan tercih edilen bir uygulamada membranda bloke edici ajan kullanılmamaktadır.

Primerler, enzimler, probalar gibi amplifikasyonu yürütmeye yönelik reaktifler birinci göze önceden yüklenebilmektedirler, böylece amplifikasyon için numuneyi doğrudan almaya hazır olmaktadır. Özellikle bu tür reaktifler, ayrışmalarını veya vaktinden önce reaksiyona girmemelerini sağlamak için kurutulmuş ve özellikle dondurularak kurutulmuş halde mevcut olabilmektedirler. Öte yandan özel bir uygulamada bu tür reaktifler, reaktifleri dış yüzeyinde dondurularak kurutulmuş olarak bulunduran, uygun şekilde bir "tıpa", çubuk veya başlık formunda olan bir reaktif dağıtıcısının kullanılmasıyla cihaza verilmektedirler. Bu nedenle reaktif dağıtıcısı, reaktifler katıldıktan sonra birinci gözü kapatmak üzere de hareket etmektedir.

Bu tür reaktif dağıtıcıları, belirli bir nükleik asit testine spesifik olacaklarından cihazlara ayrı olarak sağlanabilmektedirler, diğer yandan cihazlar genel olarak bir dizi testte kullanılabilmektedir. Öte yandan cihazlarla birlikte sağlanabilmektedirler ve böylece buluş ayrıca yukarıda açıklandığı gibi bir cihazın ve bir reaktif dağıtıcısının (veya bir tıpa, çubuk veya başlık) bir kombinasyonunu sağlamaktadır. Tıplar, çubuklar veya başlıklar gibi reaktif dağıtıcıları, nemden uzak kalmalarını sağlamak için kombinasyonun cihaz gibi diğer elemanlarından ayrı paketlenen bir sızdırmaz kap içinde uygun şekilde sağlanmaktadır.

Her durumda amplifikasyon tamponu gibi amplifikasyon reaksiyonunun sıvı bileşenlerinin yalnızca amplifikasyon reaksiyonunun başında birinci göze aktarılması tercih edilmektedir. Bu işlem, kontaminasyon risklerini en aza indirerek reaksiyonların vaktinden önce meydana gelmesini önlemektedir.

Bunun elde edilmesi için cihaz, test tamponları gibi sıvı reaktiflerle önceden yüklenmiş olan bir kapalı dördüncü gözü uygun şekilde içermektedir. Böylece bu dördüncü göz, reaktifler için bir rezervuar olarak hareket etmektedir. Ayrıca bir kanal aracılığıyla birinci göze bağlanmaktadır, böylece içindekiler bir amplifikasyon reaksiyonu gerçekleştirilmesi gerektiğinde birinci göze iletilebilmektedir.

Genel olarak yürütülen amplifikasyon reaksiyonunun nükleik asit sekansı bazlı amplifikasyon (NASBA), iplik displasman amplifikasyonu (SDA), transkripsiyon aracılı amplifikasyon (TMA), Loop Aracılı İzotermal Amplifikasyon (LAMP), Q-beta replikaz ve yuvarlanan çember amplifikasyonu, 3SR, ramifikasyon amplifikasyonu (Zhang et al.,
 5 Molecular Diagnosis (2001) 6 No 2, p141-150 tarafından açıklandığı gibi), rekombinaz polimeraz amplifikasyonu (TwistDx'ten temin edilebilir) ve diğerleri gibi alanda bilinen pek çok izotermal amplifikasyon reaksiyonlarından biri olması tercih edilmektedir.

Numune, gerekmesi halinde ve numune uygun bir formdaysa doğrudan birinci göze katılabilmektedir. Öte yandan genel olarak yukarıda bahsedildiği gibi nükleik asitlerin
 10 numunelerden, özellikle biyolojik numunelerden ekstrakte edilmesi ve saflaştırılması gerekmektedir.

Cihaz ayrıca bir nükleik asit ekstraksiyon ve/veya saflaştırma sistemi içerebilmektedir. Bu sistem çeşitli formlarda olabilmesine rağmen bir numuneden saflaştırılmış nükleik asitlerin ekstrakte edilmesinin özellikle tercih edilen yolları, WO2007/104962 sayılı
 15 belgede açıklandığı gibi bir emici membranın kullanılmasını içermektedir. Bir sıvı numunenin LFD'lere göre yukarıda açıklanan tipte bir emici membran boyunca akmasına imkân vererek nükleik asitlerin, membranın yüzeyine bağlı hale geldiği görülmüş olup, bu böylece nükleik asitin numunedeki malzemenin geriye kalanından ayrılmasının bir yolunu sağlamaktadır. Cihaza nükleik asit ekstraksiyonu ve
 20 saflaştırması amaçları için bir emici membran dâhil edilebilmektedir.

Membran, kontaminasyon riskini en aza indirmek için büyük ölçüde tamamen cihaz içerisinde yer alabilmektedir. Bir numune tutucu veya alma gözü olarak hareket eden beşinci bir göz ve birinci göz arasında uzanacak şekilde düzenlenmektedir, böylece beşinci gözdeki numune membran boyunca birinci göze emilebilmektedir. Uygun şekilde
 25 membran en azından kısmen birinci gözün açıklığı üzerinden uzanmaktadır. Bu düzenlemeyle membranın küçük bir bölümü, örneğin yukarıda açıklanan tıpanın, çubuğun veya başlığın üzerinde sağlanan bir kesicinin kullanılmasıyla ondan kesilebilmektedir. Bu işlem, membran bölümünün birinci göze düşmesine yol açmaktadır, bunun üzerine bir amplifikasyon reaksiyon karışımı oluşturmak için tıpa,
 30 çubuk veya başlık üzerindeki diğer reaktiflerle ve dördüncü gözden gelen tamponla karıştırılabilmektedir. Ardından membran bölümünde bulunan herhangi bir nükleik asit amplifiye edilmektedir.

Bazı durumlarda beşinci gözün, numune alma gözü olarak hareket edebilmesine rağmen genellikle bir numunenin önceden işlemeye tabi tutulması, örneğin nükleik asit ondan ekstrakte edilmeden önce hücresel içeriklerin serbest bırakılması için numunede bulunan hücrelerin veya mikro organizmaların lizizi tercih edilmektedir. Bu amaçla

5 beşinci göz yukarıda açıklandığı gibi kapatılabilmekte ancak uygun bir kanal aracılığıyla cihazda sağlanan açık bir altıncı göze bağlanabilmektedir. Bu durumda sıvı numunesi, beşinci göze ve emici membranın uç bölgesine aktarılmadan önce ön liziz adımı için altıncı göze katılabilmektedir. Bu durumda aktarım hidrolik veya pnömatik basınç kaynağı gibi bir kinetik enerji kaynağı veya bir vakum kaynağı kullanılarak uygun şekilde

10 gerçekleştirilebilecek ve böylece beşinci ve altıncı gözler aparatın kinetik enerji sistemine bağlantı için uygun şekilde düzenlenmiş olan portlarla donatılacaktır. Bir pnömatik sistem olması durumunda beşinci göze bağlı olan uygun havalandırma portlarına da ihtiyaç duyulabilmektedir.

Hücre lizizi çeşitli şekillerde gerçekleştirilebilmektedir. Örneğin guanidin hidroklorür veya

15 deterjan gibi bir kaotropik ajan numune alma gözüne katılabilmekte veya içinde önceden dağıtılabilmektedir. Öte yandan numune alma gözünde hücre lizizinin gerçekleştirildiği uygun yöntemler ısı veya sonikasyon uygulanması ve özellikle gözün numune alma gözünde yaklaşık 100°C sıcaklıklara kadar ısıtılması gibi esasen fiziksel yollarla olabilmektedir. Cihazın test için yerleştirildiği aparat bu nedenle bu prosesi

20 gerçekleştirebilecek ısıtma araçlarıyla veya bir sonikasyon cihazıyla donatılmaktadır.

Numune alma gözü (beşinci ya da altıncı göz) örneğin numune katıldıktan sonra ve cihaz bir testin gerçekleştirilmesi amacıyla aparat içerisinde konumlandırılmadan önce veya konumlandırıldıktan sonra bir başlık veya tıpa ile uygun şekilde kapatılabilir.

Sıvı numunelerin alındığı yerlerde bunlar numune alma gözüne (beşinci veya altıncı

25 göz) liziz işleminden önce katılabilmektedirler. Öte yandan numune eküvyon çubuğu numunesi gibi katı haldeyse test malzemesinin serbest kalması için eküvyon çubuğunun yıkanması gerekebilmektedir. Bu durumda cihaz uygun şekilde kapatılan ve bir yıkama akışkanı içeren bir yedinci gözle donatılabilmektedir.

Böylece kullanım sırasında yukarıda açıklanan cihaz onu almak üzere uyarlanmış

30 aparata yüklenmektedir. Aparatta sağlanan kontrol edilebilir ısıtma elemanları, içinde nükleik asit amplifikasyon reaksiyonu yürütme amacıyla birinci gözle ve isteğe bağlı olarak ayrıca gerekirse ısıyla hücre lizizini başlatmak için bir numune alma gözüyle etkileşime girebilmektedir. Aparat, sıvıların bir gözden diğerine aktarılması ve uygun

gözlerin otomatik olarak ve nükleik asitin bir numuneden tek bir işlemde ekstrakte edilmesini, saflaştırılmasını, amplifiye edilmesini ve saptanmasını sağlayan bir sırada ısıtılması dâhil olmak üzere prosesin çeşitli aşamalarını gerçekleştirmek üzere uygun şekilde programlanmaktadır.

- 5 Burada bir numunede bir nükleik asitin saptanması için bir testin yürütülmesine yönelik sistem açıklanmaktadır; söz konusu sistem istemlere göre bir cihaz içermektedir.

Cihaz, nükleik asit amplifikasyonunu ve saptamasını gerçekleştirmek üzere yararlı ve kullanımı kolay bir araç sağlamaktadır. Proseste gerekli olan reaktiflerin cihazdaki kapalı gözlerde depolanmasıyla ve cihazın tek kullanımlık yapılmasıyla kontaminasyon riskleri en aza indirilmektedir.

10

Şekil 1, bir numuneden nükleik asit ekstraksiyonu, ayrıca ekstrakte edilen nükleik asitin amplifikasyonu ve amplifiye edilen ürünün saptanması için düzenlenmiş tek kullanımlık bir cihazın şematik gösterimidir.

Buluş şimdi özellikle, örnek olarak ve ekli Şekil 2-8'e atıfla aşağıda tarif edilecektir.

- 15 Şekil 2, bir numunede nükleik asitin amplifikasyonu ve saptanması için tek kullanımlık cihazın bir alternatif formunun şematik gösterimidir;

Şekil 3, bir cihazın bir alternatif formunun şematik plan görünümüdür,

Şekil 4, Şekil 3'teki cihazın bir şematik yandan görünümüdür,

Şekil 5, bir cihazın bir başka alternatif formunun bir şematik plan görünümüdür,

- 20 Şekil 6, Şekil 5'teki cihazın bir şematik alttan görünümüdür,

Şekil 7, bir cihazın bir kısmının, birinci gözün Şekil 5'te gösterilene alternatif bir düzenlemesiyle şematik alttan görünümüdür ve

Şekil 8, bir cihazın model testte kullanılmasından sonraki gösterimidir.

Karşılaştırmalı Örnek

- 25 Şekil 1'deki cihaz, bir üst kapak plakası (3) ve bir alt taban plakası (4) arasında sandviç olan bir merkezi blok (2) içeren, esasen bir laminar konstrüksiyon olan bir plastik mahfaza (1) içermektedir. Merkezi blok (2), içinde, gösterildiği gibi gözleri bağlayan

kanallarla (12, 13, 14, 15 ve 16) birlikte bir dizi göz (5, 6, 7, 8, 9, 10 ve 11) içermektedir. Ek kanallar (17, 18, 19, 20, 21 ve 22) gözlerin çoğunu mahfazanın (1) üst kapağında (3) sağlanmış pnömatik portlara (sırasıyla 23, 24, 25, 26, 27 ve 28) bağlamaktadır. Kapak (3) ayrıca bir numune alma gözü olarak hareket etmesine imkân vermek için gözlerden (6) biriyle hizalanmış bir açıklık (29) ve bir amplifikasyon odası olarak hareket eden, gözlerden (8) bir diğeriyle hizalanmış ayrı bir açıklık (30) içermektedir. Öte yandan geriye kalan tüm gözler kapakla (3) etkili şekilde kapanarak sızdırmaz hale gelmektedir.

Bir emici membran (31) gövdedeki (2) bir yatay geçit içerisinde düzenlenmiştir ve göz (7) ve göz (8) arasında amplifikasyon odası uzanmaktadır. Membranın (31) zıt uçları, göz (7) ve (8)'de yer almaktadır, böylece gözdeki (7) sıvı membran boyunca göze (8) doğru emilecektir. Membranın (31) en azından bir kısmı uygun şekilde kapaktaki (3) açıklık (30) boyunca uzanmaktadır.

Gövde (2) içerisindeki benzer bir geçit, gözden (16) uzağa uzanmaktadır ve bu geçitte bir yanal akış cihazı (32) yer almaktadır.

Bir numune alındıktan sonra gözü (6) kapatmak üzere bir tıpa (33) sağlanmaktadır. Bir başka tıpa (34) amplifikasyon odası gözünü (8) kapatmak üzere sağlanmaktadır. Öte yandan tıpa (34) uygun şekilde yüzeyde dondurarak kurutulmuş formda bir amplifikasyon reaksiyonunu gerçekleştirmek için gereken reaktiflerin en azından bazılarını taşımaktadır. Tıpa (34) göze itilirken gözün (8) açıklığı (30) boyunca uzanan membrandan (31) bir numune kesmek üzere uyarlanmış bir kesici (gösterilmemiştir) de içerebilmektedir. Kesilen numune ardından amplifikasyona hazır olarak göze (8) düşmektedir.

Ekstraksiyon/amplifikasyon/saptama prosesinde kullanılan belirli reaktifler kapalı gözlerden bazılarına önceden yüklenmektedir. Özellikle bir numune yıkama sıvısı, bir numune yıkama haznesi olarak hareket eden göze (5) yüklenmektedir. Benzer şekilde amplifikasyon reaksiyonunda kullanıma yönelik tampon, uygun şekilde birinci gözle (8) benzer boyutları olan göze (9) yüklenmektedir. Son olarak göze (10) bir elüsyon seyrelticiyi yüklenmektedir.

Kullanımdan önce yapışkanlı plastik bant, film veya tabaka gibi bir tek kullanımlık örtü kapak (3) üzerine uygulanmaktadır, böylece açıklıklar (30, 31) ve portlar (23, 24, 25, 26, 27 ve 28) iki amaçla sızdırmaz hale getirilmektedir; birincisi, atmosferik kontaminasyonu önleme (böylece cihaz içerisindeki gözler ve uygun olan yerlerde içerikleri saf

kalmaktadır) ve ikincisi, portlardan hava akışını önleme, böylece sıvıları ilgili gözlerinde tutma.

Kullanım sırasında aşağıdaki işlem akışı uygulanmaktadır:

- 5
 - kullanıcı cihazı (1) paketinden çıkarmaktadır, pnömatik portları (23, 24, 25, 26, 27 ve 28) ve numuneyi ve amplifikasyon gözlerini (30, 31) açıkta bırakmak için bandı kapaktan (3) sökmektedir. Cihaz (1) ardından pnömatik portların (23, 24, 25, 26, 27 ve 28) bir pnömatik kaynağına bağlanacağı şekilde cihazı barındırmak üzere uyarlanmış bir aparata yüklenebilmektedir. Ayrıca gözler (6, 8) aparattaki uygun ısıtma veya termostat cihazlarıyla hizalanmaktadır.
- 10
 - Bir sıvı numune kullanılacaksa kullanıcı bunu bir numune portu olarak hareket eden göze (6) yüklemektedir ve numune tıpası sokulmaktadır.
- 15
 - Numune bir eküvyon çubuğundan elde ediliyorsa aparat (pnömatik port (23) ve kanal (17) aracılığıyla) numune yıkama rezervuarı gözünden (5) kanal (12) boyunca numune gözüne (6) numune yıkama reaktifini itmektedir ve kullanıcı eküvyon çubuğunu içeriğini yıkamak için sokmaktadır. Ardından numune tıpası (33) numune gözüne (6) sokulmaktadır.
- 20
 - Numune gözü (6) DNA'nın numune matrisinden ekstrakte edilmesi için aparat tarafından (yaklaşık 100°C'ye) ısıtılmaktadır.
 - Aparat ardından (sırasıyla pnömatik port (23 veya 24) ve kanallar (17 ve 12 veya 18) aracılığıyla) ekstraksiyon ürününü (kanal (19) ve pnömatik port (25) aracılığıyla havalandırmayla) membrana (31) temas edecek şekilde kanal (13) aracılığıyla bitişik göze (7) itmektedir.
 - Aparat ardından numunenin kılcal hareketle membran (31) boyunca geçiş yapmasına imkân vermek için yeterli bir süreyle pasif kalmaktadır.
- 25
 - Bir dış yüzeyine kurutulan bir amplifikasyon reaksiyonu gerçekleştirmek için gereken amplifikasyon spesifik primerleri, enzimleri gibi reaktifleri taşıyan tıpa (34) ardından amplifikasyon odası olarak hareket eden göze (8) sokulmaktadır. Tıpa (34) göze (8) (kullanıcı tarafından manuel olarak ya da aparat tarafından otomatik olarak) sokulduğunda gözün (8) dibine düşen membranın (31) ucunu
- 30
 - deecek şekilde düzenlenmiş bir kesici taşımaktadır.

- Aparat (pnömatik port (26) ve kanallar (14 ve 20) aracılığıyla) tampon ve tuz çözeltileri gibi sıvı test reaktiflerini(kanallar (16 ve 22) aracılığıyla pnömatik porta (28) havalandırmayla) göze (8) itmektedir.
- Ardından göz (8) bir nükleik asit amplifikasyon reaksiyonunu yürütmeye uygun ısıtma koşullarına maruz kalmaktadır. Örneğin göz (8) alet tarafından izotermal amplifikasyonu gerçekleştirmeye uygun bir sıcaklığa, genellikle 15-85°C aralığına, daha özel olarak 20-80°C aralığına, örneğin yaklaşık 65°C'ye ısıtılmaktadır.
- Amplifikasyon reaksiyonunun tamamlanmasıyla aparat seyrelticiyi (pnömatik port (27) ve kanallar (21 ve 15) aracılığıyla) gözden (10) itmektedir, böylece gözden (8) geçerek amplifikasyon ürünlerini toplamakta ve yanıl akış cihazının (32) numune alma bölgesiyle temas etmek için karışımı (kanallar (16 ve 22) aracılığıyla pnömatik porta (28) havalandırmayla) bitişik göze (11) aktarmaktadır. Yanıl akış cihazı (32) numunede hedef nükleik asitin veya asitlerin bulunmasına veya bulunmamasına yanıt olarak görülebilir hedef ve kontrol satırları gibi bir veya birden fazla saptanabilir sinyal üretecek şekilde kurulmaktadır.
- Alet, kullanıcının yanıl akış cihazından (32) sonucu okumasını ve cihazı (1) aparattan çıkarmasını istemeden önce bir süre tanımaktadır.

Proses uygun şekilde otomatik hale getirilmiştir, böylece basınç ilgili pnömatik portlara uygun bir sırayla uygulanmaktadır. Kullanımda olmadıklarında aparat içerisindeki valfler portları (23, 24, 25, 26, 27 ve 28) etkili şekilde kapatabilmektedir.

Örnek 1

Bir alternatif cihaz Şekil 2'de gösterilmektedir. Bu durumda bir mahfaza (40) bir başlıkla (42) kapatılabilir olan bir birinci gözü (41) içermektedir. Birinci göz (41) bir kanal (44) aracılığıyla ikinci göze (43) bağlanmaktadır. Kanal (44) göze (43) üst bölgesinden bağlanmaktadır. Hem kanal (44) hem de ikinci göz (43) mahfazada (40) gömülüdür.

Bir hedef nükleik asiti saptamak için gereken reaktiflerle donatılmış bir emici membranı içeren bir yanıl akış cihazı (45) bir alt bölgesinde göze (43) çıkıntı yapmaktadır.

Bir başka kanal (46) birinci gözün (41) alt bölgesiyle yine mahfazada (40) bulunan bir seyreltici rezervuarı (47) arasında uzanmaktadır. Seyreltici rezervuarı (47) seyrelticiyle (48) doldurulmaktadır ve bir pistonla (49) ortamdan sızdırmaz hale getirilmektedir.

5 Kullanım sırasında, bir amplifikasyon reaksiyonunu gerçekleştirmek için gereken bir hedef nükleik asiti ve reaktifleri içeren veya içerdiği düşünülen bir numune birinci göze (41) yüklenmektedir. Göz ardından başlıkla (42) kapanmaktadır ve cihaz koşullara, örneğin sıcaklık koşullarına maruz kalmaktadır, böylece gözde (41) bulunan herhangi bir hedef nükleik asit sekansı amplifiye edilmektedir ve amplifikasyon ürününün yanıl akış cihazında saptanmasına imkân vermek için gereken bağlama ajanları veya etiketler 10 ürüne dâhil edilmektedir veya örneğin hibridizasyon yoluyla bağlanmaktadır.

Amplifikasyon reaksiyonu tamamlandıktan sonra piston (49) örneğin manuel olarak çalıştırılmaktadır, bununla birlikte cihaz uygun bir aparata yerleştirilmişse otomatik olarak gerçekleştirilecek şekilde düzenlenebilmektedir. Bazı durumlarda amplifikasyon ürününü içeren gözün (41) içeriğinin seyrelticiyle karıştığı göz (48) yönünde geri 15 çekilmesini sağlamak için önce pistonun (49) çekilmesi tercih edilebilmektedir. Ardından piston (49) bastırılmaktadır. Bu gerçekleştiğinde seyreltici (48) kanal (46) boyunca rezervuardan (47) dışarı çıkarak göze (41) akmaktadır. Sonuç olarak amplifikasyon reaksiyonu ürününü içeren gözün (41) içeriği kanaldan (44) ikinci göze (43) doğru zorlanmaktadır. Göze (43) gelen sıvı, emici pedin (50) bir birinci uç bölgesiyle 20 karşılaşmaktadır ve ped (50) tarafından emilmektedir. Emici pedin (50) diğer uç bölgesi, yanıl akış cihazının (45) membranının bir numune alma bölümüyle temas halindedir. Bu nedenle sıvı, ped (50) boyunca emilmektedir ve yanıl akış cihazına güvenilir ve kontrollü şekilde iletilmektedir. Yanıl akış cihazında (45) bulunan reaktifler ve bağlama veya etiketleme reaktiflerinin amplifikasyon reaksiyonuna dâhil edilmesi sonucunda, 25 yanıl akış cihazında (45) hedef nükleik asit numunesinin varlığını veya yokluğunu gösteren bir sinyal ortaya çıkacaktır.

Bu nedenle bu cihaz minimum kontaminasyon riskiyle bir amplifikasyon ve saptama reaksiyonunu yürütmeye yönelik basit, kullanımı kolay ve güvenilir araçlar sağlamaktadır.

30 **Örnek 2**

Şekil 3'te gösterilen cihazda bir nükleik asit amplifikasyon reaksiyonunun yürütülebildiği birinci göz (51) önceki uygulamalarda olduğu gibi kanallarla (55, 56) bağlanan bir ikinci

göz (53) ve bir seyreltici gözle (54) birlikte bir mahfazada (52) sağlanmaktadır. Bu durumda öte yandan bir kanal (58) aracılığıyla kanalla (56) bağlanan bir birinci seyreltici göze (52) ilaveten bir başka seyreltici göz (57) sağlanmaktadır. Bu kanallar (56, 58) ikinci gözün (53) yukarı akış yönünde yer alan bir "T" kavşağında kesişmektedir.

- 5 Önceden olduğu gibi ikinci gözün (53) sıvı içeriği emici elyaftan (60) bir pedle bir LFD'ye (59) aktarılabilir. (59) aktarılabilir.

- Bir numune birinci gözde (51) bir nükleik asit amplifikasyon reaksiyonuna maruz kaldıktan sonra göze (51) gözden (54) gelen seyreltici akmaktadır. Uygun şekilde seyreltici gözlerinin (54, 57) her biri bir pistonla (sırasıyla 62, 63) çalıştırılmaktadır ve bunlar Şekil 4'te gösterildiği gibi bir kol (61) aracılığıyla birbirine bağlanmaktadır. Kolun (61) okla gösterilen yönde bastırılması, her iki gözden (52, 57) farklı oranlarda seyrelticiyi diferansiyel ancak kontrollü şekilde dışarı atılmasına yol açmaktadır. Kolun (61) düzenlemesi, T kavşağında gereken oranlarda karışımın sağlanacağı şekildedir. Bu da birinci gözden gelen içeriğin, ikinci göze (53) ulaştıklarında seyrelticiyle iyice karıştırılmasını sağlayacaktır.

Ardından karışım, emici elyaf (60) pedden geçerek LFD'nin (59) numune alma bölümüne geçecektir. Böylece amplifiye edilmiş hedef nükleik asitin varlığına veya yokluğuna bağlı olarak LFD'de bir sinyal ortaya çıkacaktır.

Örnek 3

- 20 Bir başka cihaz Şekil 5'te gösterilmektedir. Bu şekilde cihaz bir gövde (70) içermektedir. Üretim kolaylığı için gövde (70) aralarında, aşağıda ayrıntıları verilen çeşitli yapıların tanımlandığı bir aralayıcının (83) yer aldığı üst ve alt tabakaları (sırasıyla 70a ve 70b) içermektedir. Gövde (70) bir başlıkla (73) kapatılabilir olan bir birinci reaksiyon gözünün (72) (Şekil 6) yer aldığı bir yanal çıkıntıyla (71) donatılmaktadır.
- 25 Gövdede (70) yer alan bir kanal (74) reaksiyon gözü (72) ve birinci gözden (72) daha büyük olan ve gövdenin (70) yapısında gömülü olan bir ikinci göz (75) arasında uzanmaktadır. Bir emici ped (76) ikinci göze (75) çıkıntı yapmaktadır. Emici pedin (76) gözden (75) uzak olan bir ucu, bir yanal akış test elemanının bir uzun emici membranının (77) birinci ucuna temas etmektedir. Membranın üzerinde ya immobilize ya da alanda geleneksel olduğu gibi serbest olan, belirli bir hedef nükleik asit için spesifik olan bağlama ajanları ve etiketlenmiş bağlama ajanları vardır. Bunlar, hedef nükleik asiti içeren sıvı emici pedden (76) membranın (77) uzak ucuna doğru kılcal

akışla bunun boyunca emildikçe hedefin sıvıda bulunup bulunmadığına bağlı olarak bir görülebilir sinyalin ortaya çıkacağı şekilde düzenlenmektedirler. Uygun şekilde gövde (70) şeffaftır, böylece herhangi bir sinyal görülebilmektedir. Öte yandan gerekirse sinyal ortaya çıkışının görülmesine imkân vermek için gövdede (70) bir görüntüleme penceresi

5 sağlanabilmektedir.

Membran (77) gövde (70) içerisindeki bir açıklığı (78) geçecek ve yine gövdenin (70) yapısında gömülü olan bir dizi enine direk (79) uzunluğu boyunca desteklenecek şekilde düzenlenmektedir.

Seyreltici için bir üçüncü göz (80) gövdede (70) sağlanmaktadır ve bir pistonla (81) kapatılabilir. Göz (80) ayrıca reaksiyon gözünden (72) daha büyük hacme sahiptir ve bir ikinci kanalla (82) göze (72) bağlanmaktadır.

10

Kullanım sırasında bir nükleik asit amplifikasyon reaksiyonu karışımı gibi bir kimyasal veya biyokimyasal reaksiyon karışımı göze (72) katılmaktadır ve içinde istenen reaksiyonun gerçekleştirilmesi için uygun koşullara, örneğin sıcaklığa tabi tutulmaktadır.

15

Çıkıntı (71) bu amaçla uygun bir ısıtma aparatı ile kaplı olabilmektedir. Böylece reaksiyon gözünde (72) uygulanan koşullar, örneğin membrana (77) zarar verebilecekleri veya bunu bozabilecekleri yer olan cihazın geriye kalanına uygulanmamaktadır. Uygulanan koşullar, örneğin izotermal nükleik asit amplifikasyon reaksiyonları durumunda görece sabit bir sıcaklıkta inkübasyonu veya polimeraz zincir

20 reaksiyonu gibi geleneksel reaksiyonlarda olduğu gibi bir sıcaklık aralığında ısı döngülemeyi içerebilecek olan, gerçekleştirilen özel reaksiyona bağlı olacaktır.

Ardından seyreltici, örneğin bir sızdırmaz kaptan dağıtılarak göze (80) verilmektedir. Gerekirse sızdırmaz kap, ayrıca bir delme aracı (gösterilmemiştir) ve pistonu (81) kullanarak kabın delme aracına doğru bastırılmasıyla dağıtılan seyrelticiyi içeren göze

25 (80) önceden yüklenebilmektedir.

Dağıtımdan sonra piston (81) daha fazla bastırılarak seyrelticileri kanal (82) boyunca reaksiyon karışımıyla karıştığı ve kanala (74) ve sonrasında emici pede (76) aktığı göze (72) doğru zorlamaktadır. Bu da akan sıvıyı emerek bunu membranın (77) birinci uç bölgesine aktaracaktır. Sıvı, emici veya kılcal akışla membranın (77) uzunluğu boyunca ilerlemektedir ve bu sırada etiketleme reaktifleri gibi reaktiflerle ve hedef nükleik asitler gibi hedef elemanlarla karışacaktır ve bir yanak akış testinde geleneksel olduğu gibi

30

hedef ve/veya kontrol bölgelerinde sinyal çizgileri gibi bir sinyal ortaya çıkacaktır. Bu sinyaller gövdeden (70) okunabilmektedir.

Ardından Şekil 5 ve 6'daki cihaz atılabilmektedir. Böylece buluş, çeşitli amaçlarla kolaylıkla çalıştırılabilen basit bir cihaz sağlamaktadır. Çalıştırılması kolaydır ve numunelerin kontaminasyonu ihtimalini ve bu nedenle hatalı sonuçları en aza indirmektedir.

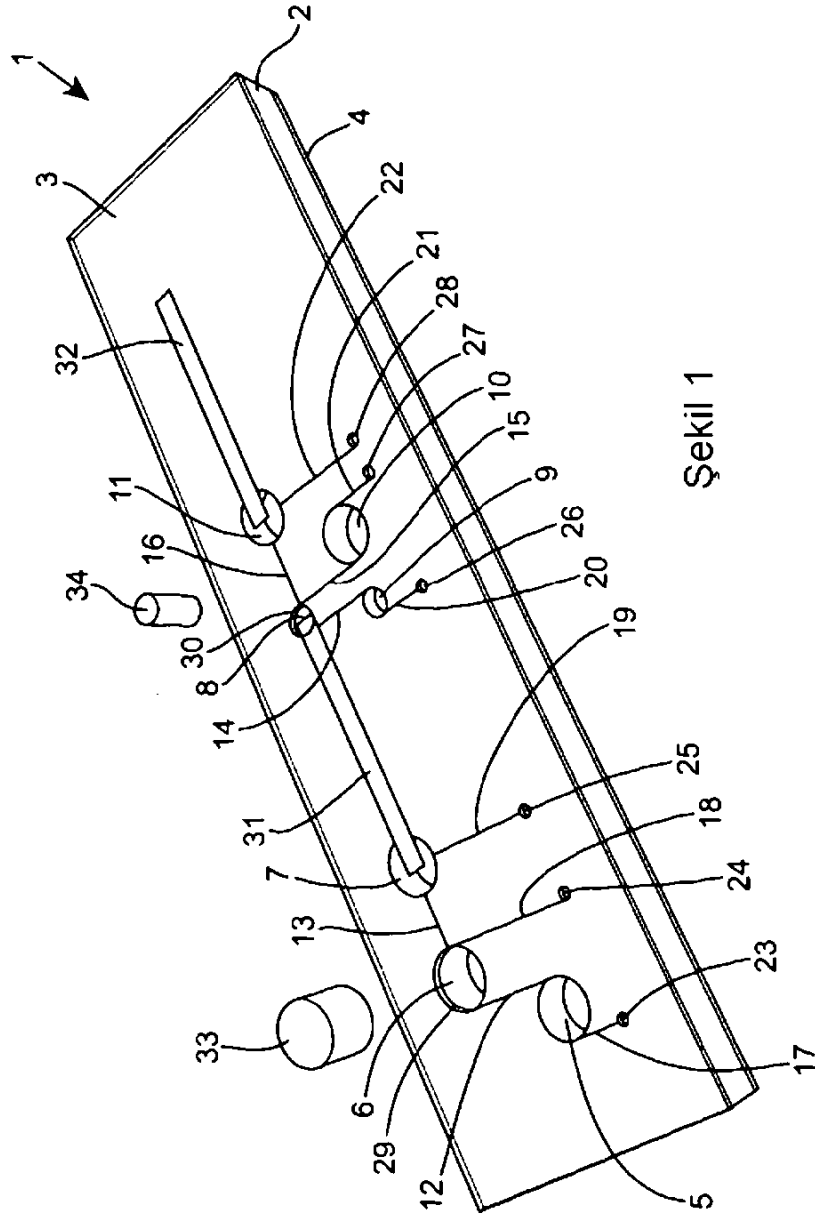
Bu cihazın modifiye edilmiş bir formunda (Şekil 7) çıkıntı (71) katıdır ancak bir sökülebilir birinci göze (72) rahat geçme oluşturabilen aşağı doğru çıkıntı yapan bir çıkıntı (83) içermektedir. Kanallar (74 ve 82) bu çıkıntıdan (83) geçerek alt yüzeyinde açılmaktadır. Kurutulmuş formdaki amplifikasyon reaktifleriyle uygun şekilde önceden yüklenen ayrı birinci göz (72) kolay kullanım için bir halkasal flanşla (84) donatılmaktadır. Bu uygulamada ayrı bir başlığa (73) gerek olmamaktadır. Kullanım sırasında bir numune birinci göze (72) uygulanmaktadır ve çıkıntı (83) gözün (72) açıklığına geçmeli olarak oturacak ve böylece onu sızdırmaz hale getirecek şekilde sokulmaktadır. Ardından cihaz, Şekil 5'teki uygulamaya göre yukarıda açıklananla aynı şekilde kullanılabilir.

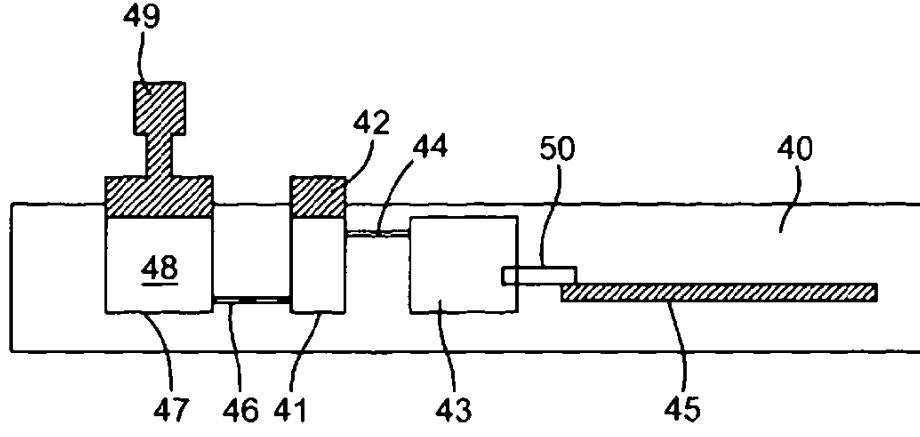
Örnek 4

Şekil 5 ve 6'da büyük ölçüde gösterilen cihaz, bir numunede at zührevi hastalığının varlığını saptamak üzere bir LAMP izotermal testinde kullanılmıştır. 10 dakika suda kaynatılarak lize edilmiş hedef bakterilerden elde edilen DNA, *Taylorella equigenitalis*'in 16S ribozomal RNA genine doğru yönlendirilmiş LAMP primerleri kullanılarak amplifiye edilmiştir. Reaksiyonun loop primerleri ya biyotinle ya da floresinle etiketlenmiştir ve bu parçalar sayesinde ürünler sırasıyla LFD'lerdeki lateks boncuklarla veya pozitif reaksiyon bölgeleriyle ilişkilendirilmiştir. Amplifikasyon, uygun tamponda (225µl PBS), cihaza yüklenmiş reaksiyonun seyreltilmesinden önce 20 dakika süreyle 65°C'de inkübe edilen GeneSys (Camberley, BK) LAMP mastermix kullanılarak reaksiyon gözünde (72) (toplam hacim 25µl) gerçekleştirilmiştir. Tampon göze (80) yüklenmiştir ve pistonun (81) bastırılmasıyla reaksiyon gözüne (72) zorlanmıştır. Seyreltilmiş amplifikasyon ürünleri, seyreltmeyle eş zamanlı olarak pozitif basınçla kanaldan (74) LFD emici malzemesi (76) üzerine zorlanmıştır. Reaksiyon ürünleri ardından hem test hem de kontrol çizgisinde reaksiyon bölgesinde biriken (ve böylece görünür hale gelen) ilişkili lateks boncuklarla birlikte kılcal hareketle LFD'nin uzunluğu boyunca ilerlemiştir. Çizgiler, hem testte (üst

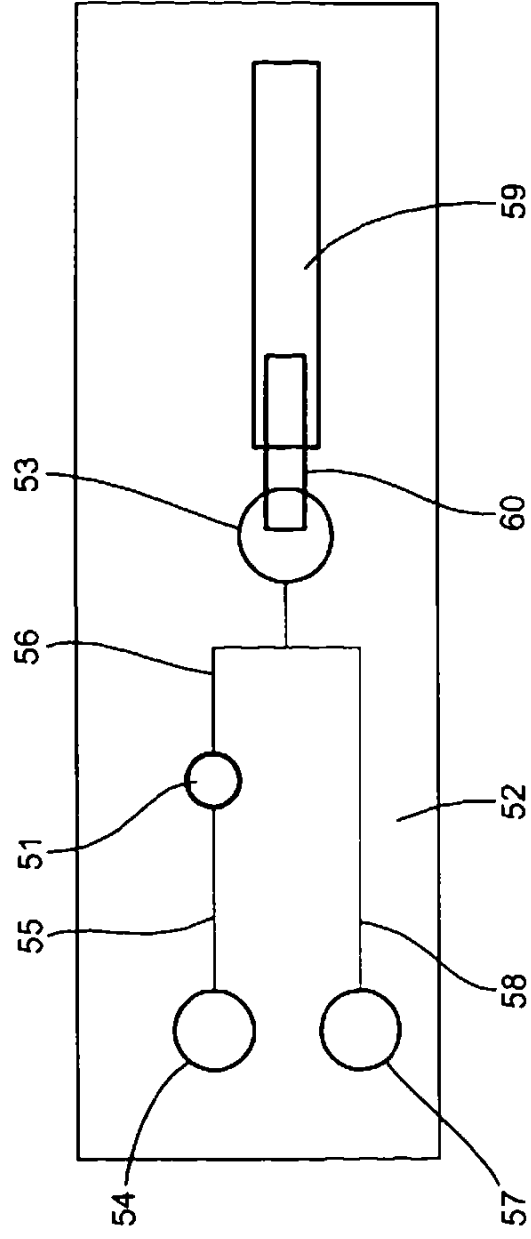
izgi) hem de kontrolde (alt çizgi) pozitif reaksiyon için belirginleřerek test malzemesinin amplifiye olduėunu ve pozitif olduėunu göstermiřtir.

şekil 8’de gösterilen sonuçlar, buluşun cihazının ve yönteminin etkili olduğunu ve yararlı sonuçlar verdiğini göstermektedir.

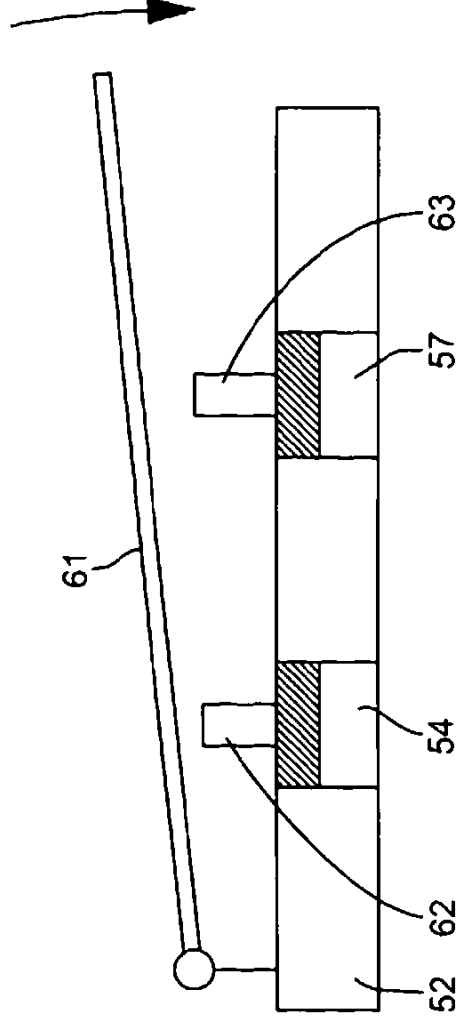




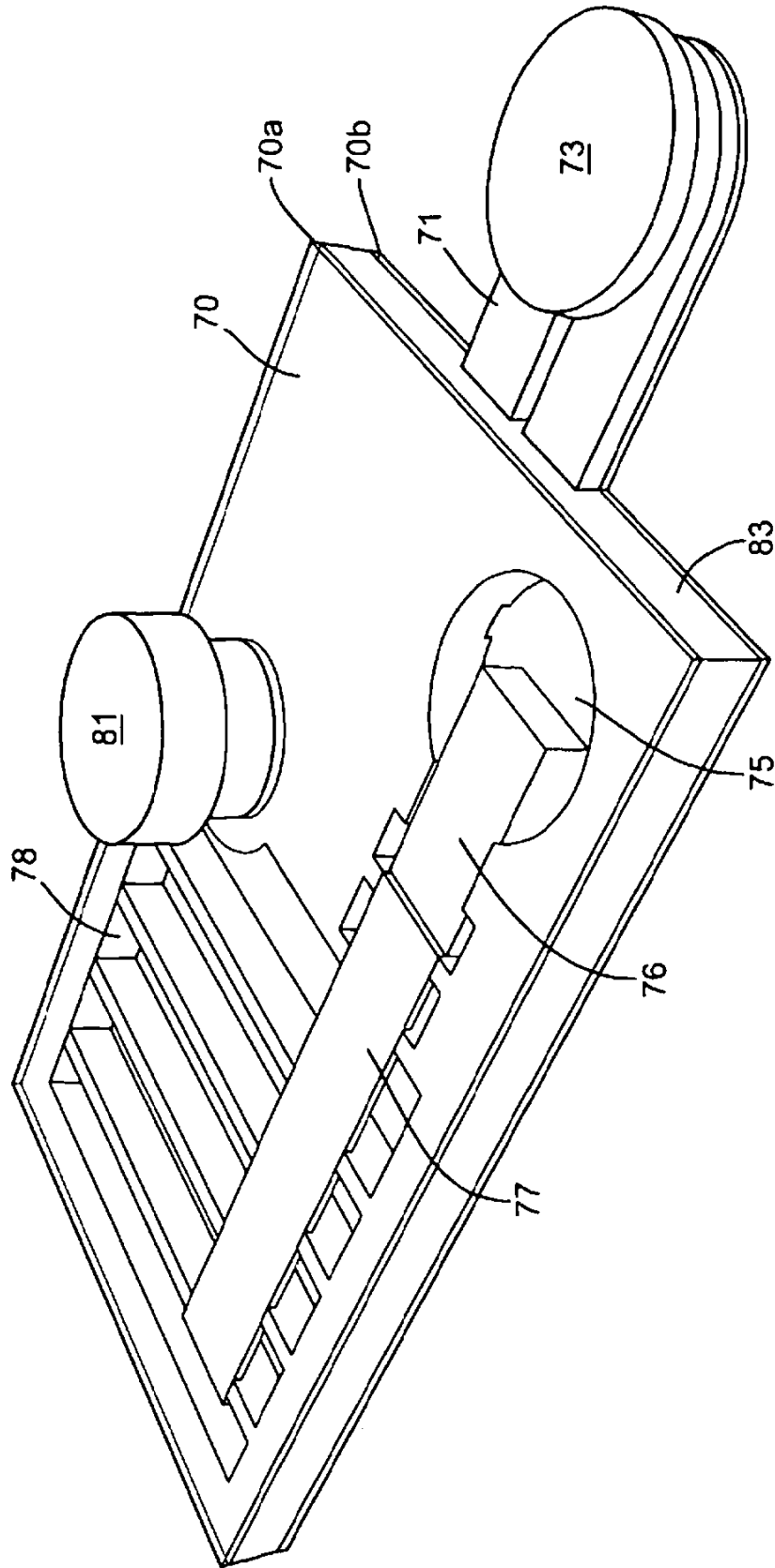
Şekil 2



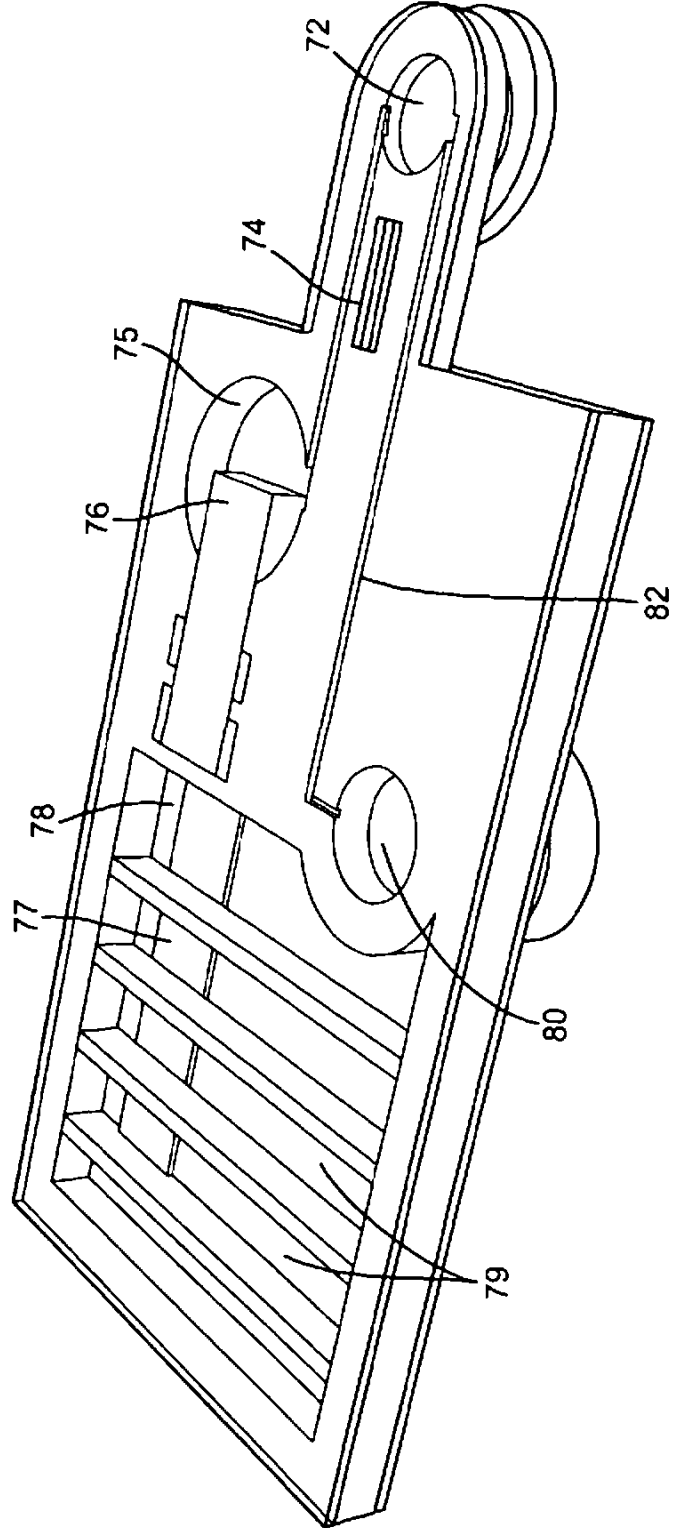
Şekil 3



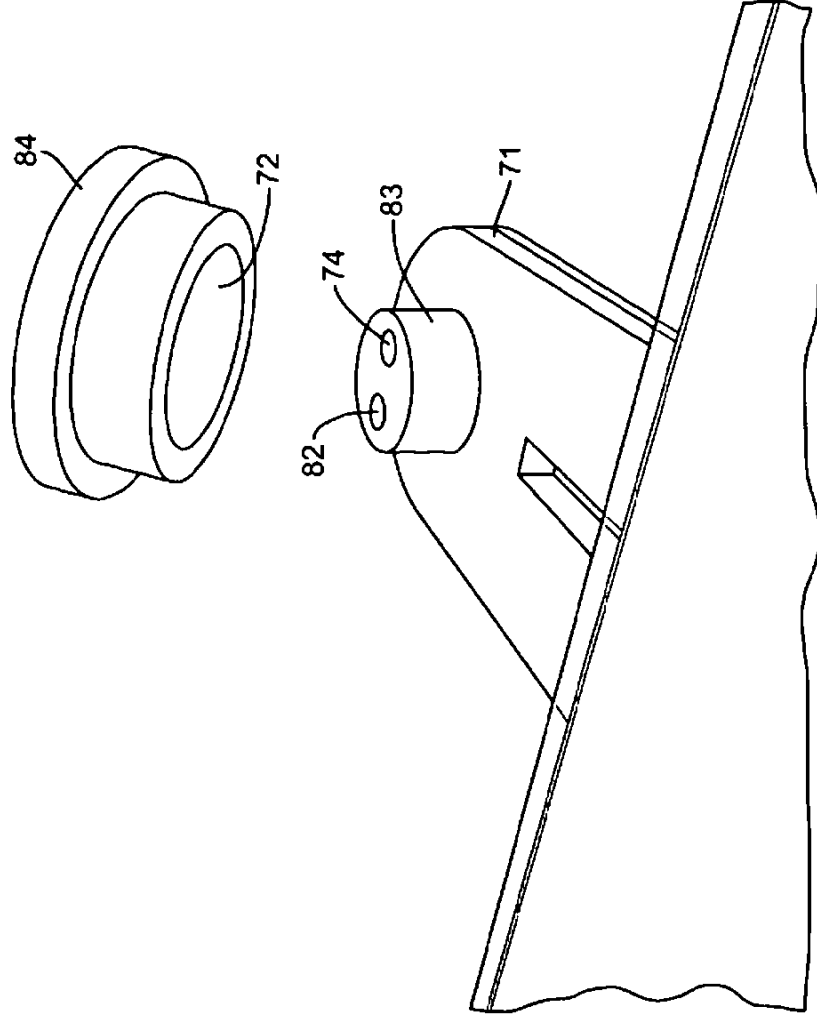
Şekil 4



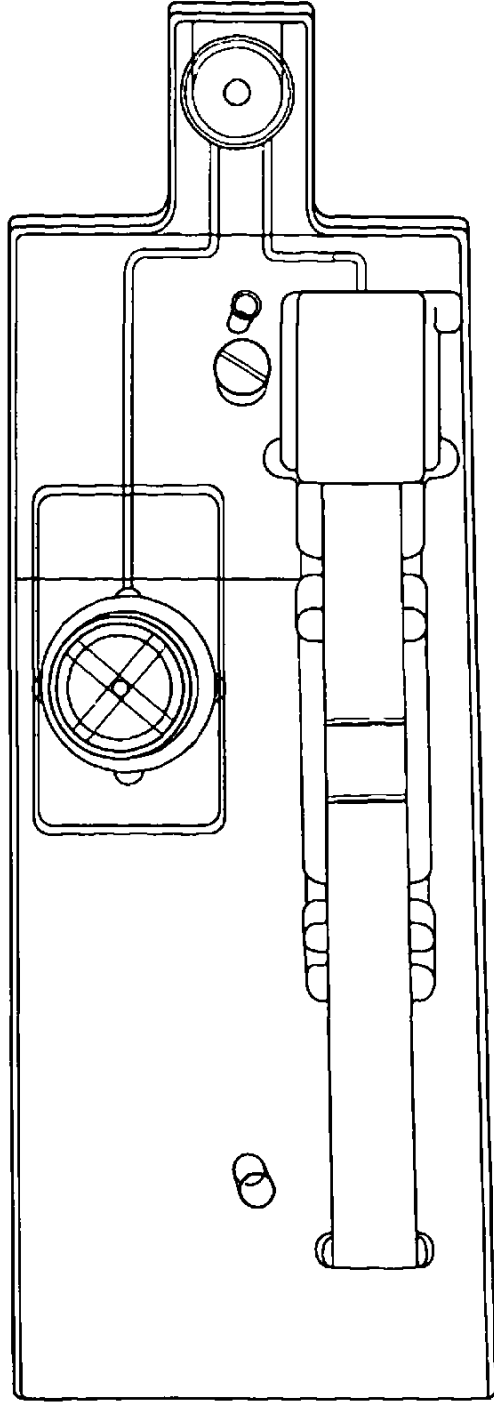
Şekil 5



Şekil 6



Şekil 7



Şekil 8