



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 1008957-8 B1



(22) Data do Depósito: 11/03/2010

(45) Data de Concessão: 22/04/2020

(54) Título: MÉTODO PARA DETECÇÃO SIMULTÂNEA DE UMA PLURALIDADE DE ÁCIDOS NUCLEICOS ALVO EXECUTADO POR UM SISTEMA DE ANÁLISE INTEGRADA EM TEMPO REAL DE ÁCIDOS NUCLEICOS ALVO

(51) Int.Cl.: C12Q 1/68; C12M 1/38; C12N 15/09.

(30) Prioridade Unionista: 08/01/2010 KR 10-2010-0002027; 10/03/2010 KR 10-2010-0021532; 11/03/2009 KR 10-2009-0020913.

(73) Titular(es): BIONEER CORPORATION.

(72) Inventor(es): YU-JEONG KIM; WAN-LIM KOO; JONG-HOON KIM; DAE-JIN JANG; JIN-CHEOL SEO; SEONG-YOUL KIM; HAE-JOON PARK; HAN OH PARK.

(86) Pedido PCT: PCT KR2010001530 de 11/03/2010

(87) Publicação PCT: WO 2010/104345 de 16/09/2010

(85) Data do Início da Fase Nacional: 12/09/2011

(57) Resumo: MÉTODO PARA DETECÇÃO SIMULTÂNEA DE UMA PLURALIDADE DE ÁCIDOS NUCLEICOS ALVO EXECUTADO POR UM SISTEMA DE ANÁLISE INTEGRADA EM TEMPO REAL DE ÁCIDOS NUCLEICOS ALVO São providos um aparelho para a análise integrada em tempo real de ácidos nucleicos e um método para a detecção do ácido nucleico alvo utilizando o mesmo, e, mais particularmente, a uma análise integrada em tempo real de ácidos nucleicos para a realização simultânea de análise qualitativa ou análise quantitativa dos genes de vários tipos de amostras biológicas plurais e um método de detecção de um ácido nucléico alvo utilizando o mesmo. O aparelho para análise integrada em tempo real de ácido nucleico e o método para a detecção de um ácido nucleico alvo utilizando o mesmo, de acordo com a presente invenção, realizam testes de vários alvos necessários de várias amostras através de uma única etapa prontamente e com precisão, e assim, podem ser eficientemente utilizados por hospitais ou similares que necessitem de um rápido diagnóstico de doenças.

**MÉTODO PARA DETECÇÃO SIMULTÂNEA DE UMA PLURALIDADE DE
ÁCIDOS NUCLEICOS ALVO EXECUTADO POR UM SISTEMA DE ANÁLISE
INTEGRADA EM TEMPO REAL DE ÁCIDOS NUCLEICOS ALVO**

Campo Técnico

5 A presente invenção refere-se a um aparelho para
análise integrada de ácidos nucleicos em tempo real e um
método para a detecção de um ácido nucleico alvo utilizando
o mesmo, e, mais particularmente, a um aparelho para a
análise integrada em tempo real de ácidos nucleicos para a
10 realização simultânea de análise qualitativa ou análise
quantitativa dos genes de vários tipos de amostras
biológicas múltiplas e um método para a detecção de um
ácido nucléico alvo utilizando o mesmo.

Antecedentes da Invenção

15 Quanto ao teste de diagnóstico in vitro (teste IVD -
do inglês, in vitro diagnostic), um material alvo
específico é detectado ou quantitativamente analisado
utilizando uma amostra derivada de um corpo humano, tais
como sangue, urina, saliva ou similares, como uma amostra,
20 para fins de determinação de ocorrência, ou não, da doença
ou infecção. O teste de diagnóstico molecular ou o teste de
ácido nucleico (NAT, do inglês nucleic acid testing) é o
campo de crescimento mais veloz em um mercado de teste de
diagnóstico in vitro, mas só é realizado em grandes
25 organizações especializadas em teste de hospitais e
clínicas devido a operações complicadas.

Os testes qualitativos e quantitativos de vírus ou
germes, que causam as doenças infecciosas, atualmente
compõem a parte principal do teste de diagnóstico
30 molecular, e um teste de confirmação ou similar é realizado

para a confirmação independente dos resultados do teste de diagnóstico das doenças infecciosas ou para a confirmação dos mutantes. O número de testes de diagnóstico para a identificação precoce de tumores e o aumento da eficácia dos métodos terapêuticos estão aumentando rapidamente. O teste de diagnóstico molecular é variavelmente aplicado em um campo da medicina personalizada (individualizada) para a detecção de genes anormais, determinação de métodos terapêuticos, seleção de medicamentos e avaliação da eficácia dos medicamentos, a respeito das doenças causadas por predisposição genética pessoal.

Um sistema automatizado para o teste de diagnóstico molecular utilizado atualmente foi desenvolvido de modo que todo o curso de extração, amplificação, identificação e similares de ácido nucleico seja automatizado. Por exemplo, quanto a um sistema de amostragem direta de tubos (DTS) TIGRIS, da Gen-Probe, que é o primeiro sistema automatizado aprovado pela agência norte-americana reguladora de alimentos e medicamentos, a Food and Drug Administration, a captura de alvos, a amplificação, a identificação e a saída dos resultados dos testes são automatizados. O sistema pode examinar a infecção de *Neisseria gonorrhoea*, que é um agente patogênico da gonorreia, como uma das doenças venéreas representativas e a *Chlamydia trachomatis*, que é um agente patogênico de uma doença sexualmente transmissível. Como outro exemplo, um sistema COBAS (Ampliprep, analisador Taqman), da Roche Molecular Systems, o sistema m2000 (m2000sp, m2000rt) da Abbott, o sistema GeneXpert da Cepheid, o analisador Liat (Lab-in-a-tube) da IQuum Inc., foram desenvolvidos em um sistema automatizado com base em

uma reação em cadeia da polimerase (PCR) e foram lançados no mercado.

No entanto, de acordo com o sistema automatizado atual, uma vez que a preparação de amostras, a análise quantitativa em tempo real e o relatório relativo a um tipo de amostra são executados em uma única etapa, é impossível realizar a preparação de amostras, da análise quantitativa e da análise qualitativa em tempo real e o relatório de vários tipos diferentes de amostras simultaneamente e em uma vez.

Em particular, o número de pacientes com hepatite b é alto, enquanto que o número de pacientes com tuberculose, não. Nesse caso, os testes têm de ser adiados por vários dias, até à obtenção de uma quantidade predeterminada de amostra. No caso onde o teste de diagnóstico é realizado em vários tipos de amostra, um teste diferente precisa ser realizado em cada tipo, o que requer experiências repetitivas, e, assim, muitos testes não podem ser realizados em um dia. É necessário muito tempo na coleta de amostras para a detecção da hepatite b, e a separação, purificação e amplificação do ácido nucleico, a fim de detectar o vírus da hepatite B.

Dessa maneira, há a necessidade de muito tempo a fim de se obter o mesmo tipo de amostras múltiplas, e trata-se de um desperdício a utilização de um reator de amplificação de ácido nucleico de 96 poços a fim de analisar apenas diversas amostras de hepatite B. Nesse caso, por fim, um aparelho é inutilmente operado, ou as amostras necessitam ser ainda coletadas. Por essa razão, os hospitais de pequeno e médio porte não podem executar os vários testes

clínicos em um número relativamente pequeno de amostras clínicas devido às limitações econômicas e temporais e, assim, terceirizam os testes para as organizações de teste externas, resultando em tempo, custos e esforços maiores.

5 Divulgação

Problema Técnico

Os presentes inventores, enquanto estudavam um sistema automatizado capaz de extrair, analisar e relatar os diversos tipos de alvos de uma única vez, desenvolveram um
10 aparelho para a análise integrada em tempo real de ácidos nucleicos de coleta de vários tipos de amostras, de extração de ácidos nucleicos de vários tipos de amostras no mesmo dia, e de detecção simultânea dos ácidos nucleicos em um único amplificador de ácido nucleico, de modo a permitir
15 que hospitais de pequeno e médio porte dotados de um número relativamente pequeno de amostras para a realização, com eficiência, de vários testes de diagnóstico, e um método para a análise de ácidos nucleicos alvo utilizando os mesmos, e, então, concluíram a presente invenção.

20 Um objeto da presente invenção é o fornecimento de um aparelho para a análise integrada em tempo real de ácidos nucleicos capaz de realizar, simultaneamente, a análise qualitativa ou a análise quantitativa dos genes correspondentes para uma pluralidade de tipos de amostras
25 biológicas.

Outro objeto da presente invenção é o fornecimento de um método para a detecção de um ácido nucleico alvo utilizando o aparelho para a análise integrada em tempo real de ácidos nucleicos.

30 Solução Técnica

A presente invenção fornece um aparelho para a análise integrada em tempo real de ácidos nucleicos capaz de realizar, simultaneamente, a análise qualitativa ou a análise quantitativa dos genes de uma pluralidade de tipos de amostras biológicas.

A presente invenção também fornece um método para a detecção de um ácido nucleico alvo a partir de amostras biológicas contendo ácidos nucleicos, utilizando o aparelho para a análise integrada em tempo real de ácidos nucleicos.

Um aparelho para a análise integrada em tempo real de ácidos nucleicos, a fim de realizar simultaneamente a análise qualitativa ou a análise quantitativa de ácidos nucleicos alvo correspondentes a vários tipos de amostras biológicas, sendo que o aparelho para a análise integrada em tempo real de ácidos nucleicos compreende: uma pluralidade de instrumentos automatizados de purificação e distribuição 100 que separam e purificam os ácidos nucleicos alvo de vários tipos de amostras biológicas contendo os ácidos nucleicos alvo; um amplificador em tempo real de ácido nucleico 200 que inclui um bloco de circulação de temperatura de múltiplos poços 210, e a medição em tempo real da quantidade de diferentes tipos de ácidos nucleicos alvo obtidos pela pluralidade de instrumentos automatizados de purificação e distribuição 100; um controlador que atribui múltiplos poços no bloco de circulação de temperatura 210 do amplificador em tempo real de ácidos nucleicos 200 pela unidade de coluna, de acordo com os tipos dos ácidos nucleicos alvo, de forma correspondente a diferentes tipos de ácidos nucleicos alvo respectivamente separados e purificados pelos instrumentos

automatizados de purificação e distribuição 100, armazena informações sobre as amostras biológicas de instrumentos automatizados de purificação e dispensação 100 de forma correspondente aos respectivos poços atribuídos pela
5 unidade de coluna, realiza a amplificação simultânea nas mesmas condições do bloco de circulação de temperatura e realiza a gestão integrada de modo que os resultados de amplificação, pelos quais os ácidos nucleicos alvo respectivos são analisados quantitativa e qualitativamente,
10 correspondam às amostras biológicas respectivas submetidas à separação e à purificação por instrumentos automatizados de purificação e dispensação 100; e uma unidade de vídeo 300 que gera os resultados da análise qualitativa ou quantitativa em tempo real a partir do controlador.

15 Na atribuição dos múltiplos poços no bloco de circulação de temperatura 210 do amplificador em tempo real de ácidos nucleicos 200 pela unidade de coluna, de acordo com tipos de ácidos nucleicos alvo, e no armazenamento de informações sobre as amostras biológicas de acordo com os
20 instrumentos automatizados de purificação e dispensação 100 de maneira correspondente aos respectivos poços atribuídos pela unidade de coluna, as informações sobre uma amostra padrão positiva, uma amostra padrão negativa, ou uma amostra padrão quantitativa podem ser adicionalmente
25 armazenadas.

O amplificador em tempo real de ácido nucleico 200 pode compreender kits de diagnóstico carregados no bloco de circulação de temperatura de múltiplos poços 210, sendo que os kits de diagnóstico contêm diferentes tipos de ácidos
30 nucleicos obtidos a partir da pluralidade de instrumentos

automatizados de purificação e distribuição 100;

O bloco de circulação de temperatura de múltiplos poços 210 pode ser um bloco de circulação de temperatura de 96 poços composto por 12 colunas x 8 fileiras de poços.

5 Os itens de medição podem ser seletivamente definidos no bloco de circulação de temperatura de múltiplos poços 210 pela unidade de coluna.

O controlador, quando um controle positivo interno (IPC) é separado juntamente com vários tipos de amostras biológicas em cada instrumento automatizado de purificação e dispensação 100, pode determinar a partir do produto de amplificação pelo amplificador em tempo real de ácidos nucleicos 200 se o ácido nucleico é separado com êxito pelo instrumento automatizado de purificação e dispensação 100 e, dessa maneira, determinar se a separação de ácido nucleico é repetida.

O controlador pode detectar qualitativamente a presença ou ausência de ácidos nucleicos alvo, através da comparação dos valores de Ct das respectivas amostras biológicas, que são obtidos por meio de amplificação simultânea nas mesmas condições do amplificador em tempo real de ácidos nucleicos 200, com um valor de Ct fundamental.

O controlador pode determinar quantitativamente o destino de ácidos nucleicos dentro da amostra, através da comparação dos respectivos valores de Ct obtidos por meio de amplificação simultânea de uma concentração conhecida da amostra padrão quantitativa e respectivas amostras biológicas nas mesmas condições do amplificador em tempo real de ácidos nucleicos 200, com um gráfico quantitativo

do valor de Ct da amostra padrão quantitativa, a fim de calcular o número de ácidos nucleicos alvo.

O instrumento automatizado de purificação e dispensação 100 pode incluir um cartucho contendo várias amostras biológicas contendo ácidos nucleicos e tampões utilizados para a extração de ácidos nucleicos dessas, um bloco de congelamento, um bloco de alta temperatura, um barril de licor residual, um cartucho de pipeta, e um bloco de pipeta, sendo o bloco de pipeta móvel em um substrato sobre o qual os blocos e os cartuchos são fornecidos, permitindo a fixação e o desprendimento de pipetas, e incluindo uma unidade de aplicação de campo magnético para a aplicação ou o cancelamento de um campo magnético para as pipetas, e informações sobre as respectivas amostras padrão e amostras biológicas e informações sobre os ácidos nucleicos alvo de acordo com os instrumentos automatizados de purificação e dispensação 100 podem ser armazenados no controlador.

O amplificador em tempo real de ácidos nucleicos 200 pode incluir o bloco de circulação de temperatura de múltiplos poços, cuja temperatura varia de acordo com os níveis de temperatura pré-determinados, uma fonte de luz de irradiação para a irradiação de luz sobre os tubos de reação carregados no bloco de circulação de temperatura, e um sensor de detecção de luz fluorescente para o recebimento de luzes geradas a partir dos tubos de reação, e os itens de medição são definidos e armazenados pela unidade de coluna de poços atribuídos.

O aparelho para a análise integrada em tempo real de ácidos nucleicos pode incluir ainda uma unidade de banco de

dados de armazenamento 400 que armazena os resultados da análise.

Em outro aspecto geral, um método para a detecção de ácidos nucleicos que utiliza um aparelho para a análise integrada em tempo real de ácidos nucleicos alvo inclui: 1) a separação e a purificação de ácidos nucleicos contidos nas respectivas amostras a partir de várias amostras biológicas contendo amostras-padrão e ácidos nucleicos por uma pluralidade de instrumentos automáticos de purificação e separação 100 e, então, a aplicação da solução assim separada e purificada em um tubo de reação de mistura de reação de amplificação de ácido nucleico; 2) a atribuição de poços em um bloco de circulação de temperatura de múltiplos 210 pela unidade de coluna, de acordo com os tipos de ácidos nucleicos alvo, de modo que o bloco de circulação de temperatura de múltiplos 210, sobre o qual os tubos de reação de mistura de reação de amplificação de ácido nucleico devem ser carregados, e os ácidos nucleicos alvo respectivos separados e purificados pelos instrumentos automáticos de purificação e dispensação 100, correspondam entre si, e o armazenamento de informações nas amostras-padrão e nas amostras biológicas separadas pelos instrumentos automáticos de purificação e dispensação 100, de forma correspondente aos respectivos poços atribuídos pela unidade de coluna; 3) o carregamento dos tubos de reação preparados na etapa 1) nos respectivos poços em concordância com as informações armazenadas nas amostras biológicas nos respectivos poços dos blocos de circulação de temperatura de múltiplos poços 210 do amplificador em tempo real de ácidos nucleicos; e 4) a amplificação

simultânea dos respectivos ácidos nucleicos alvo carregados no bloco de circulação de temperatura 210 do amplificador em tempo real de ácidos nucleicos sob a mesma condição e a realização da análise qualitativa ou análise quantitativa dos ácidos nucleicos alvo respectivos para a pluralidade de amostras biológicas, e, assim, obter os resultados de amplificação.

Na etapa 1), um controle positivo interno (IPC) pode ser adicionado à amostra biológica, seguida da separação do ácido nucleico, no instrumento automatizado de purificação e dispensação 100, e a eficácia na detecção do ácido nucleico alvo pode ser determinada por determinação, a partir dos resultados da amplificação, de se o ácido nucleico alvo é separado, com êxito, no instrumento automatizado de purificação e dispensação 100, e da eficiência de amplificação.

O tubo de reação de mistura de reação de amplificação de ácidos nucleicos pode ser preparado através da aplicação da solução de ácido nucleico separada e purificada em um tubo de reação, no qual os componentes necessários para a amplificação de ácidos nucleicos estão contidos em um tipo de seco, e da mistura da solução com os componentes.

O controle positivo interno pode ser partícula de vírus mosaico do tabaco quando o ácido nucleico alvo for o RNA.

O controle positivo interno pode ser DNA de plasmídeo ou produto de PCR quando o ácido nucleico alvo for o DNA.

Efeitos Vantajosos

Conforme estabelecido acima, o aparelho para a análise integrada em tempo real de ácidos nucleicos pode executar

automaticamente a separação e a purificação de ácidos nucleicos a partir de vários tipos de amostras biológicas, através da utilização de ao menos dois instrumentos automatizados de purificação e dispensação, pode analisar
5 simultaneamente várias amostras de uma só vez no amplificador em tempo real de ácidos nucleicos, e pode reduzir o tempo e o custo para o teste utilizando um controlador que gerencia os instrumentos automatizados de purificação e dispensação e o amplificador em tempo real de
10 ácidos nucleicos.

Além disso, de acordo com o método de detecção de um ácido nucleico alvo que utiliza o aparelho para a análise integrada em tempo real de ácidos nucleicos, pode-se confirmar se os ácidos nucleicos para as amostras
15 biológicas respectivas são separados ou não, e se ocorrem problemas durante o procedimento de amplificação no amplificador em tempo real de ácido nucleico, através da adição de controles internos positivos da presente invenção juntamente com as amostras biológicas no instrumento
20 automatizado de purificação e dispensação durante a separação e a purificação de ácido nucleico.

Além disso, múltiplos poços do bloco de circulação de temperatura de múltiplos poços podem ser atribuídos de acordo com os tipos dos ácidos nucleicos alvo, de forma
25 correspondente para diferentes tipos de ácidos nucleicos alvo separados e purificados nos instrumentos automatizados de purificação e dispensação, e, assim, os testes de vários alvos requeridos de várias amostras podem ser realizados paralelamente através de uma única etapa. Portanto, a
30 presente invenção pode ser eficientemente utilizada por

hospitais ou o similares que necessitem de um rápido diagnóstico das doenças.

Descrição dos Desenhos

Os objetos, características e vantagens acima e outros
5 da presente invenção se tornarão evidentes a partir da descrição a seguir das modalidades preferidas, fornecidas em conjunto com os desenhos de acompanhamento, nos quais:

A FIG. 1 é uma vista esquemática de um aparelho para a análise integrada em tempo real de ácidos nucleicos de
10 acordo com a presente invenção;

A FIG. 2 é uma vista de um bloco de circulação de temperatura de múltiplos poços 210 fornecido em um amplificador em tempo real de ácidos nucleicos de acordo com a presente invenção;

15 A FIG. 3 é uma vista de uma unidade de vídeo 300 de acordo com a presente invenção;

A FIG. 4 é uma vista que mostra um diagrama de fluxo do aparelho para a análise integrada em tempo real de ácidos nucleicos de acordo com a presente invenção;

20 A FIG. 5 é uma vista que mostra uma parte de poço de carregamento de amostras de um cartucho em um instrumento automatizado de purificação e dispensação de acordo com a presente invenção;

A FIG. 6 é uma vista que mostra um gráfico de reações
25 em cadeia da polimerase em tempo real (PCRs) do vírus do mosaico do tabaco modelos padrão (TMV) em relação às partículas de vírus mosaico do tabaco (IPC), de acordo com a presente invenção;

A FIG. 7 é uma vista que mostra uma curva padrão
30 (inclinação: -0,283, R2:1) para o gráfico das PCRs em tempo

real dos modelos padrão do vírus mosaico do tabaco modelos padrão (TMV) a partir de partículas do vírus mosaico do tabaco (IPC), de acordo com a presente invenção;

5 A FIG. 8 é uma vista que mostra um gráfico de PCRs em tempo real dos DNAs do modelo padrão de HBV em um amplificador de ácidos nucleicos em tempo real, utilizando kits de PCR quantitativos de HVB, de acordo com a presente invenção;

10 A FIG. 9 é uma vista que mostra uma curva padrão (inclinação: -0,2882, R2: 0,9997) para o gráfico de PCRs em tempo real dos DNAs do modelo padrão de HBV em um amplificador de ácidos nucleicos em tempo real, utilizando kits de PCR quantitativos de HVB, de acordo com a presente invenção;

15 A FIG. 10 é uma vista que mostra um gráfico de PCRs em tempo real dos RNAs do modelo padrão de HCV em um amplificador de ácidos nucleicos em tempo real, utilizando kits de RT-PCR quantitativos de HCV, de acordo com a presente invenção; e

20 A FIG. 11 é uma vista que mostra uma curva padrão (inclinação: -0,2970, R2: 0,9998) para o gráfico de PCRs em tempo real dos RNAs do modelo padrão de HCV em um amplificador de ácidos nucleicos em tempo real, utilizando kits de RT-PCR quantitativos de HCV, de acordo com a
25 presente invenção;

Descrição Detalhada dos Elementos Principais

100: instrumento automatizado de purificação e dispensação

200: amplificador em tempo real de ácidos nucleicos

30 300: unidade de vídeo

400: unidade de banco de dados de armazenamento

Melhor Modo

Aqui, um aparelho para a análise integrada em tempo real de ácidos nucleicos será descrita em detalhes com
5 referência aos desenhos de acompanhamento. Os desenhos a seguir são fornecidos a título de exemplo para que a ideia da presente invenção possa ser suficientemente transferida aos técnicos no assunto ao qual se refere a presente invenção, e possa ser elaborada exageradamente.

10 Salvo indicação em contrário, deve-se compreender que todos os termos utilizados no relatório descritivo, incluindo os termos técnicos e científicos, possuem o mesmo significado que aqueles que compreendidos pelos técnicos no assunto, e que, adicionalmente, na descrição e nos desenhos
15 de acompanhamento abaixo, as funções ou construções bem conhecidas não serão descritas em detalhes uma vez que elas podem obscurecer desnecessariamente o entendimento da presente invenção.

Exemplo 1

20 O Exemplo 1 é direcionado a um aparelho para a análise integrada em tempo real de ácidos nucleicos de acordo com a presente invenção. A FIG. 1 é uma vista esquemática de um aparelho para a análise integrada em tempo real de ácidos nucleicos de acordo com a presente invenção, e, doravante,
25 a presente invenção será descrita em maiores detalhes.

O aparelho para a análise integrada em tempo real de ácido nucleico inclui uma pluralidade de instrumentos automatizados de purificação e distribuição 100 para a separação e purificação dos ácidos nucleicos alvo a partir
30 de vários tipos de amostras biológicas contendo os ácidos

nucleicos alvo; A amostra biológica significa um material biológico separado do ambiente natural e que contém ácidos nucleicos. A amostra biológica de acordo com a presente invenção pode ser uma solução de ácido nucleico, 5 microrganismo, tecidos, fluidos biológicos, ou células, que são purificados ou separados. Os exemplos de fluido biológico podem incluir sangue, plasma, saliva, urina, fluido espinhal cerebral, líquido de lavagem gástrica, leucoforese, várias amostras obtidas do corpo humano, e 10 similares, mas sem limitação a esses. A amostra da presente invenção pode ser uma amostra derivada de qualquer planta, animal, corpo humano, germe ou vírus, contendo ácidos nucleicos. Os exemplos do ácido nucleico da presente invenção podem geralmente incluir DNA, RNA, PNA, híbrido de 15 DNA e RNA, ou um material contendo esses, mas sem qualquer limitação. O aparelho da presente invenção pode ser utilizado na separação e na detecção de um material, tal como uma proteína.

Com referência à Fig. 1, os instrumentos automatizados 20 de purificação e dispensação 100 da presente invenção podem ser instalados em pluralidade, de preferência, de 2 para 6, a fim de separar os ácidos nucleicos de um único tipo de, pluralidade de tipos de, ou vários tipos de amostras. O instrumento automatizado de purificação e dispensação 100 25 da presente invenção caracteriza-se pelo fato de que uma partícula magnética é ligada de maneira reversível a um ácido nucleico para a separação do ácido nucleico, a fim de separar os ácidos nucleicos de um grande número de soluções de amostras biológicas.

30 O instrumento automatizado de purificação e

dispensação 100 automaticamente purifica e dispensa os ácidos nucleicos, e inclui um cartucho contendo várias amostras biológicas que contêm ácidos nucleicos e tampões utilizados para a extração de ácidos nucleicos a partir
5 desses, um bloco de congelamento, um bloco de alta temperatura, um barril de licor residual, um cartucho de pipeta, e um bloco de pipeta. O bloco de pipeta pode mover para sobre um substrato no qual os blocos e cartuchos acima são fornecidos, permitindo a fixação e o desprendimento de
10 pipetas, e incluindo uma unidade de aplicação de campo magnético para a aplicação ou o cancelamento de um campo magnético para as pipetas. O bloco de pipeta pode permitir a fixação e o desprendimento das pipetas 8 a 16.

As partículas magnéticas utilizadas na separação dos
15 ácidos nucleicos de um grande número de soluções de amostras biológicas se ligam aos ácidos nucleicos em um tampão. Se um campo magnético for aplicado à pipeta enquanto os ácidos nucleicos ligados às partículas magnéticas são aspirados na pipeta, as partículas
20 magnéticas ligam-se ao aglomerado de ácidos nucleicos na pipeta e aderem a um interior da pipeta, e os outros materiais são descarregados para fora da pipeta.

Assim como a partícula magnética da presente invenção, uma partícula magnética fina dotada de uma ampla superfície
25 é preferivelmente utilizada.

Na presente invenção, um ímã permanente ou um eletroímã pode ser utilizado como uma unidade de aplicação de campo magnético para a aplicação do campo magnético na pipeta, e o campo magnético pode ser aplicado
30 reversivelmente na pipeta. A solução pode ser descarregada

por um pistão conectado à pipeta durante a operação da pipeta, e a pipeta é movível por uma unidade movedora de pipeta.

Assim como o instrumento automatizado de purificação e dispensação 100 da presente invenção, um aparelho automatizado de purificação e dispensação comumente conhecido pode ser utilizado, e, por exemplo, um aparelho descrito no registro de patente coreana nº 148239, US5702590, US5647994, EP 0691541, US 5336760, US5897783, US6187270, e no pedido de patente coreana nº 10-2008-0032904 pode ser utilizado. Além disso, o Sistema totalmente Automatizado de Purificação de Proteínas de DNA/RNA ExiPrep™ 16 da Empresa Bioneer pode ser utilizado preferencialmente como o instrumento automatizado de purificação e dispensação 100 da presente invenção.

O ácido nucleico separado e purificado pelo instrumento automatizado de purificação e dispensação 100 é dispensado em um kit de diagnóstico constituído de um tubo de unidade de reação previamente nele carregado. O kit de diagnóstico constituído de um tubo em tiras de 8 poços, no qual o ácido nucleico é dispensado no instrumento automatizado de purificação e dispensação 100, é retirado, e selado com uma película transparente e, em seguida, carregado na coluna atribuída em um amplificador de ácidos nucleicos em tempo real. Uma operação em tempo real do amplificador de ácidos nucleicos é executada, e, assim, os resultados são automaticamente elaborados.

Uma unidade de reconhecimento de código de barras (não mostrada) pode ser adicionada à pluralidade de instrumentos automatizados de purificação e distribuição 100 para a

separação e a purificação dos ácidos nucleicos alvo a partir de várias amostras biológicas contendo os ácidos nucleicos alvo. As informações de amostra biológica reconhecidas pela unidade de reconhecimento de código de barras podem ser armazenadas como banco de dados em um controlador, que é um software gerenciador de sistemas dentro do aparelho para a análise integrada em tempo real de ácidos nucleicos, e essas informações podem ser automaticamente aplicadas também no amplificador em tempo real de ácidos nucleicos 200. O código de barras apresenta um conteúdo necessário para a distinção dentre amostras, tais como sexo, idade, tipos e similares das amostras biológicas.

A presente invenção inclui um amplificador em tempo real de ácido nucleico 200 que inclui diferentes tipos de ácidos nucleicos alvo obtidos a partir da pluralidade de instrumentos automatizados em tempo real de purificação e distribuição 100;

O amplificador de ácidos nucleicos em tempo real 200 da presente invenção inclui um bloco de circulação de temperatura de múltiplos poços 210, no qual os kits de diagnóstico correspondentes aos ácidos nucleicos separados e purificados a partir do instrumento automatizado de purificação e dispensação 100 são carregados, e cuja temperatura varia de acordo com os níveis de temperatura pré-determinados, uma fonte de luz para a irradiação de luz em tubos de reação carregados no bloco de circulação de temperatura, e um sensor de detecção de luz fluorescente para o recebimento da luz gerada a partir de etiquetas detectáveis dentro dos tubos de reação. O sensor de

detecção de luz fluorescente permite os resultados da análise qualitativa e quantitativa em tempo real em relação aos ácidos nucleicos alvo.

Assim como o amplificador de ácido nucleico em tempo real 200 da presente invenção, que é um aparelho que permite a PCR em tempo real, um aparelho para a reação em cadeia da polimerase (PCR) de ácido nucleico em tempo real pode ser utilizado, e, preferivelmente, um aparelho descrito na patente coreana nº 794703, um aparelho descrito no PCT/KR2008/064558, ou o Bloco Térmico Quantitativo em Tempo Real Exicycler™ 96, um produto da empresa Bioneer, são selecionados e utilizados.

O amplificador em tempo real de ácido nucleico 200 inclui o bloco de circulação de temperatura de múltiplos poços 210. O bloco de circulação de temperatura de múltiplos poços 210 é composto por 96 poços de 12 colunas x 8 fileiras. Os respectivos poços são particionados pela unidade de coluna, e, dessa maneira, atribuídos pela unidade de coluna. Assim, a quantidade de amplificação de ácidos nucléicos respectivos e das informações alvo de acordo com diferentes tipos de ácidos nucleicos alvo pode ser exibida pela unidade de coluna através da unidade de vídeo 300 em tempo real. No presente exemplo, os itens de detecção de ácidos nucleicos alvo são definidos pela unidade de coluna de poços, mas, sem limitação a esses, eles podem ser definidos pela unidade de linha ou pela unidade de poço.

Na presente invenção, o aparelho para a análise integrada em tempo real de ácidos nucleicos pode incluir ainda uma unidade de banco de dados de armazenamento 400

que armazena os resultados da análise.

O amplificador em tempo real de ácidos nucleicos 200 da presente invenção armazena informações sobre os tipos de ácidos nucleicos alvo separados e purificados pelos instrumentos automatizados de purificação e dispensação 100 e as amostras biológicas. Além disso, o amplificador em tempo real de ácido nucleico 200 atribui múltiplos poços no bloco de circulação de temperatura de múltiplos 210 pela unidade de coluna, de acordo com os tipos de ácidos nucleicos alvo separados dos instrumentos automáticos de purificação e dispensação 100. Uma ou mais colunas são preferencialmente atribuídas no bloco de circulação de temperatura de múltiplos poços. Os ácidos nucleicos separados da amostra biológica e das amostras-padrão são colocados nos respectivos poços dentro de cada área atribuída que é definida para apresentar o mesmo destino de detecção, e as informações relacionadas são armazenadas para cada poço.

Na presente invenção, um "poço 211a" significa cada poço do bloco de circulação de temperatura de múltiplos poços 210 sobre o qual um tubo de reação do kit de diagnóstico pode ser carregado. Os respectivos alvos de detecção são definidos pela unidade de coluna do bloco de circulação de temperatura de múltiplos poços do amplificador de ácido nucleico de acordo com os tipos de kits de diagnóstico.

A presente invenção inclui um software gerenciador de aparelhos para a análise integrada em tempo real de ácidos nucleicos controlando os instrumentos automatizados de purificação e dispensação 100, controlando o amplificador

em tempo real de ácidos nucleicos 200, transmitindo as informações a partir do aparelho automatizado de purificação e dispensação para o amplificador de ácidos nucleicos em tempo real, e armazenando e gerenciando as
5 informações do amplificador de ácidos nucleicos em tempo real.

O kit de diagnóstico utilizado na presente invenção inclui uma etiqueta detectável, e é composto por tubos de reação 500 nos quais um iniciador (primer) para a
10 amplificação de um ácido nucleico alvo específico, e um tampão estão contidos na mesma quantidade.

Na presente invenção, o "tubo de reação 500" significa um recipiente que contenha uma amostra nele. De 1 a 96, preferencialmente 8, 12, 16 ou 96 tubos de reação podem ser
15 preparados. O tubo de reação pode ser um dente ou um tubo formado em um material plástico ou similar, e pode ser um tubo tendo um padrão regular, por exemplo, um tipo de treliça de placa de reação de 96 poços ou placa de reação de 384 poços, ou tipo tira de 8 poços.

Um iniciador (primer) para a amplificação do ácido nucleico alvo, uma etiqueta detectável, e um tampão estão contidos no tubo de reação 500 para o kit de diagnóstico, e o ácido nucleico separado é a ele adicionado. O volume total desse é, de preferência, de 10 a 50 μl , mas sem
25 limitações. Os diferentes iniciadores (iniciador (primer)s) e sondas nos diversos kits de diagnóstico são amplificados na mesma temperatura de anelamento (T_1). Cada tubo da unidade de reação do kit de diagnóstico contém um iniciador e uma sonda projetados para a amplificação de um ácido
30 nucleico alvo diferente.

Na presente invenção, o kit de diagnóstico é preparado por secagem de uma composição na qual um iniciador (primer) específico para a amplificação de uma parte específica de um ácido nucleico, uma sonda tendo fluorescência nele afixada, uma DNA polimerase, e dNTP são secagem. Um estabilizador pode ser adicionado. A secagem pode ser realizada por liofilização (criodessecação), secagem por aquecimento, secagem a vácuo sob pressão reduzida ou similares. Portanto, uma vez que a composição do kit de diagnóstico está presente em um tipo de secado, uma quantidade predeterminada de solução de ácido nucleico separada e purificada é adicionada, sem regulação da quantidade da composição, e, assim, prepara diretamente uma mistura de reação de amplificação de ácidos nucleicos.

Os iniciadores (iniciador (primer)s) para a detecção dos ácidos nucleicos alvo, que utilizados nos respectivos kits de diagnóstico na presente invenção, usam sequências de base projetadas para que tenham pontos de fusão semelhantes (T_m , °C) para o teste de diagnóstico de ácidos nucleicos alvo respectivos. O ponto de fusão (T_m , °C) foi projetado com base em uma parte da sequência de base do ácido nucleico alvo, e é importante para definir a mesma condição de temperatura de reação a fim de amplificar simultaneamente e seletivamente os vários ácidos nucleicos alvo com base em uma temperatura de anelamento. De acordo com a presente invenção, vários ácidos nucleicos alvo podem ser simultaneamente detectados a partir de amostras de uma pessoa ou amostras de várias pessoas. Por exemplo, os testes para o diagnóstico de AIDS, hepatite B, hepatite C, e doenças venéreas podem ser executados simultaneamente em

um único amplificador de ácidos nucleicos em tempo real sob a mesma condição de amplificação uma vez.

A FIG. 2 é uma vista de um bloco de circulação de temperatura de múltiplos poços 210 tendo uma pluralidade de poços nos quais a pluralidade de tubos de reação 500 para os kits de diagnóstico são carregados, respectivamente. Na presente invenção, o tubo de reação 500 pode ser feito em um tipo de 8 tiras, um tipo 16 tiras ou tipo de placa de 96 poços.

Com referência à Fig. 2, os tubos de reação, nos quais os ácidos nucleicos separados e purificado a partir de um mesmo tipo de amostras biológicas são injetados, são carregados em poços 211a nas colunas atribuídas, e o iniciador (primer) e/ou a sonda projetados para a amplificação do mesmo ácido nucleico alvo estão contidos em cada um dos tubos de reação carregados nas mesmas colunas.

Com referência à Fig. 2, o bloco de circulação de temperatura de múltiplos poços 210 é composto de uma pluralidade de poços. Os tubos de reação 500 para os kits de diagnóstico podem ser carregados nos poços 211^a respectivos. Na presente invenção, vários tubos de reação diferentes para os kits de diagnóstico podem ser carregados no bloco de circulação de temperatura de múltiplos poços, e os múltiplos poços do bloco de circulação de temperatura de múltiplos poços são atribuídos pela unidade de coluna, de acordo com os tipos de ácidos nucleicos alvo. Uma pluralidade de kits de diagnóstico para os diferentes ácidos nucleicos alvo é carregada no bloco de circulação de temperatura de múltiplos poços, e, assim, os múltiplos poços no bloco de circulação de temperatura de múltiplos

poços são atribuídos para os respectivos tipos de ácidos nucleicos alvo pela unidade de coluna, de modo correspondente aos diferentes tipos de ácidos nucleicos alvo. No entanto, os testes de diagnóstico são realizados sob a mesma condição de reação de amplificação.

O bloco de circulação de temperatura de múltiplos poços 210 do amplificador em tempo real de ácido nucleico da presente invenção pode ter um tipo de 96 poços (2 colunas x 8 fileiras). Os múltiplos poços no bloco de circulação de temperatura de múltiplos poços são preferivelmente definidos para que sejam atribuídos para os alvos de detecção pela unidade de uma ou duas colunas adjacentes, sem limitações.

O amplificador de ácidos nucleicos em tempo real 200 da presente invenção tem uma temperatura, que é repetidamente variada entre uma primeira temperatura como uma temperatura de anelamento (T1) e uma segunda temperatura como uma temperatura de expansão (T2), sob controle do controlador.

Portanto, os tubos de reação para os kits de diagnóstico carregados no poços 211a têm uma temperatura entre a primeira temperatura como uma temperatura de anelamento (T1) e a segunda temperatura como uma temperatura de expansão (T2), e, assim, os ácidos nucleicos são amplificados, e uma terceira temperatura pode ser necessária para a desnaturação. A primeira temperatura como uma temperatura de anelamento (T1), a segunda temperatura como uma temperatura de expansão (T2), e a terceira temperatura do bloco de circulação de temperatura de múltiplos poços 210 podem ser definidas de forma variada,

dependendo do tipo de ácido nucleico alvo.

O amplificador de ácidos nucleicos em tempo real 200 mede os graus de amplificação e as quantidades dos respectivos ácidos nucleicos alvo simultaneamente, com base nas informações sobre os tipos de ácidos nucleicos alvo e nas amostras biológicas correspondentes aos poços atribuídos no bloco de circulação de temperatura de múltiplos poços. Os ácidos nucleicos alvo são medidos por valores numéricos de sinais de etiquetas detectáveis contidas nos tubos de reação.

O nível do sinal gerado pela etiqueta é proporcional à quantidade de ácidos nucleicos alvo amplificados. O sinal da etiqueta detectável pode ser qualquer tipo de sinal que inclua, por exemplo, um sinal luminescente, um sinal de corante colorido ou um sinal radioativo. O sinal detectável é, de preferência, o sinal luminescente. O sinal luminescente pode ser um sinal fluorescente ou um sinal quimioluminescente. A luz é iluminada assim que se inicia a amplificação do ácido nucleico alvo, e o tempo de iluminação e a intensidade de iluminação são variados a depender da quantidade de amplificação do ácido nucleico alvo. Eles permitem o monitoramento da quantidade de amplificação do ácido nucleico alvo.

Na presente invenção, uma sonda ligada a uma tinta fluorescente pode ser utilizada para a detecção de sinais, e uma tinta fluorescente, tal como uma tinta intercalante, pode ser utilizada. De preferência, uma sonda duplamente etiquetada pode ser utilizada principalmente para a amplificação de ácidos nucleicos.

O amplificador de ácidos nucleicos em tempo real 200

inclui um controlador. O controlador armazena as informações sobre os tipos de ácidos nucleicos alvo separados pelos instrumentos automatizados de purificação e dispensação 100 e as respectivas amostras biológicas separadas e purificadas pelos instrumentos automatizados de purificação e dispensação 100, atribui vários poços para os respectivos tipos de ácidos nucleicos alvo de forma correspondente aos diferentes tipos de ácidos nucleicos alvo separados e purificados por instrumentos automatizados de purificação e dispensação 100, simultaneamente amplifica todos os ácidos nucleicos alvo sobre o bloco de circulação de temperatura de múltiplos poços nas mesmas condições, e mede e determina os ácidos nucleicos alvo respectivos que são simultaneamente amplificados, com base nas informações sobre os tipos de ácidos nucleicos alvo correspondentes às colunas atribuídas e das amostras biológicas atribuídas para os respectivos poços.

Todas as informações mantidas pelo controlador são inseridas a partir de um usuário, e as informações de entrada (inseridas) deverão ser armazenadas e mantidas.

Neste amplificador de ácidos nucleicos em tempo real de 200, a quantidade de amplificação de ácidos nucleicos de destino respectivos e as informações alvo são apresentadas através da unidade de vídeo 300 em tempo real, de acordo com os tipos de kits de diagnóstico para a detecção de ácidos nucleicos alvo diferentes, que são carregados no bloco de circulação de temperatura de múltiplos poços 210 pela unidade de coluna ou pela unidade de poço.

A FIG. 3 é uma vista de uma unidade de vídeo 300 de acordo com a presente invenção. Com referência à Fig. 3, a

unidade de vídeo 300 pode incluir uma primeira unidade de vídeo 302 de exibição das informações nas colunas atribuídas do amplificador de ácidos nucleicos em tempo real 200, uma segunda unidade de vídeo 301 de medição e
5 representação gráfica da quantidade de ácido nucleico alvo amplificado no tubo de reação da unidade, e um seletor de poço 303 de permissão para um usuário selecionar e visualizar individualmente os poços 211a. Pela seleção do usuário através do seletor de poços 303, os resultados de
10 diagnóstico para um ou mais tubos de reação da unidade são exibidos em cores diferentes ao mesmo tempo, e, assim, as diferenças nos resultados do diagnósticos podem ser exibidas claramente e forma distinguível.

O aparelho para a análise integrada de ácidos nucleicos em tempo real de acordo com a presente invenção
15 inclui um controlador para o gerenciamento integrado dos instrumentos automatizados de purificação e dispensação e o amplificador de ácido nucleico em tempo real, e, mais especificamente, para a transmissão de dados de amostras
20 biológicas da purificação automatizada e instrumentos de dispensa para o amplificador de ácidos nucleicos em tempo real, e para a análise qualitativa ou quantitativa dos resultados de amplificação e informação de ácidos nucleicos alvo dos diferentes tipos de ácidos nucleicos alvo, que são
25 obtidos a partir do amplificador em tempo real de ácidos nucleicos.

O aparelho integrado para a análise de ácidos nucleicos em tempo real da presente invenção é operado por um software do controlador, que é dividido em quatro, ou
30 seja, 1) entrada de informações, 2) separação e purificação

de ácido nucleico no instrumento automatizado de purificação e dispensação 100, 3) execução do amplificador em tempo real de ácidos nucleicos 200, e 4) atualização do resultado e da análise, conforme mostrado na Fig. 6. O software do controlador da presente invenção controla toda a operação. O software executa a função de BD e manutenção, controle e manutenção dos instrumentos automatizados de purificação e dispensação, executar, análise, controle e manutenção do amplificador de ácidos nucleicos em tempo real, e similares.

O aparelho para a análise integrada em tempo real de ácidos nucleicos da presente invenção é composto de dois computadores, três instrumentos automatizados de purificação e dispensação, e um amplificador em tempo real de ácidos nucleicos. Primeiramente, o software do controlador baseia-se nos dados de entrada em um software gerenciador de aparelhos de análise integrada em tempo real de ácidos nucleicos por um usuário. Um dos dois computadores é um computador para o software gerenciador de aparelho integrado de análise em tempo real de ácidos nucleicos no qual um BD local, um software gerenciador de sistema integrado em tempo real de ácidos nucleicos, e um programa de instrumento automatizado de purificação e dispensação são instalados. O outro computador é para um programa de amplificador de ácidos nucleicos em tempo real. Os computadores respectivos transmitem e recebem dados através de TCP/IP. O computador para o software gerenciador de análise integrada em tempo real de ácidos nucleicos se comunica com os três instrumentos automatizados de purificação e dispensação através de TCP/IP. O computador

para o amplificador de ácidos nucleicos em tempo real se comunica com o amplificador de ácidos nucleicos em tempo real através de uma USB. O aparelho para a análise integrada em tempo real de ácidos nucleicos é constituído de um ambiente cliente servidor dentre os computadores, e um ambiente de cliente servidor entre o software gerenciador de aparelhos de análise integrada em tempo real de ácidos nucleicos e os instrumentos automatizados de purificação e dispensação.

Mais especificamente, um BD principal está presente em cada sítio do hospital. Os dados relacionados às amostras são inseridos no banco de dados (BD) principal pelo programa gerenciador de aparelhos de análise integrada de ácidos nucleicos em tempo real. Através desse trabalho, é fornecida uma lista de trabalho no DB local utilizado no aparelho para a análise integrada de ácidos nucleicos em tempo real. A lista de trabalho fornecida é atribuída aos respectivos instrumentos automatizados de purificação e dispensação utilizando um código de barras ou tipo de atribuição automática pelo usuário. Após a conclusão da atribuição, os instrumentos automatizados de purificação e dispensação são operados. Após a conclusão de uma operação, é realizada a atualização. O computador para o software gerenciador de aparelhos de análise integrada em tempo real de ácidos nucleicos verifica se há a atualização e, assim, conclui a atualização no BD local. O software gerenciador de análise integrada em tempo real de ácidos nucleicos da presente invenção pode controlar vários instrumentos de purificação e dispensação de ácido nucleico simultaneamente e individualmente, e pode gerenciar o seu estado de

operação.

O computador para o software gerenciador de aparelho integrado de ácidos nucleicos em tempo real notifica o usuário de que o amplificador de ácidos nucleicos em tempo
5 real está pronto. OS tubos de reação são carregados em um bloco de circulação de temperatura de múltiplos poços do tipo de 96 poços, após o recebimento da notificação, por parte do usuário. Quando há a conclusão do carregamento dos tubos de reação, o amplificador de ácidos nucleicos em
10 tempo real é executado. Após a conclusão da execução, o computador para o software gerenciador de aparelhos integrados em tempo real de ácidos nucleicos notifica o usuário se um programa de análise é em execução, ou não. Após a conclusão da análise, a conclusão e a finalização
15 são realizadas pelo usuário. O computador para o software gerenciador de aparelhos integrados em tempo real de ácidos nucleicos verifica a conclusão de todas as operações e análises. O BD local é atualizado após a conclusão da verificação.

20 Em primeiro lugar, as informações de dados precisam ser inseridas a fim de operar o aparelho para a análise integrada em tempo real de ácidos nucleicos da presente invenção. A entrada de informações de dados significa que o usuário insere as informações de dados de acordo com a
25 amostra em conformidade com o banco de dados dentro do programa gerenciador integrado do computador para o software gerenciador de aparelhos integrados de ácidos nucleicos em tempo real. Quando há a entrada de informações de dados, os protocolos utilizados de acordo com os kits de
30 diagnóstico são definidos. Em outras palavras, um nome de

uma amostra é inserido, e um kit de diagnóstico, um tipo de ácido nucleico, um tipo de fonte de amostra, e um protocolo de separação são selecionados. O número de amostras a ser inserido é selecionado e, em seguida, o botão "entrada" é pressionado. No instrumento automatizado de purificação e dispensação, os poços do cartucho são respectivamente "atribuídos" utilizando as informações de dados inseridas. Na presente invenção, os termos "auto atribuição" e "atribuição" de código de barras são suportados como "atribuição". A "atribuição de" é executada automaticamente em uma ordem na qual as amostras a serem purificadas são clicadas (escolhidas). Quando a "atribuição" é concluída, cada um dos instrumentos automatizados de purificação e dispensação se encontra em um estado operável. Os respectivos instrumento e unidades do instrumento automatizado de purificação e dispensação são operados pelo usuário. O software do instrumento automático de purificação e dispensação armazena todas as informações relacionadas à operação. O software do instrumento automático de purificação e dispensação fornece informações de progresso sobre o tempo, o estado de progresso, e similares, no momento da operação, ao usuário. O tempo de operação do instrumento automatizado de purificação e dispensação é de cerca de 40 a 50 minutos. Quando a operação do instrumento automatizado de purificação e dispensação é concluída, o software gerenciador de aparelhos de análise integrada em tempo real de ácidos nucleicos realiza a detecção automática. Após a detecção automática, uma operação do amplificador em tempo real de ácido nucleico, que é um processo seguinte, é instruída.

No presente exemplo da presente invenção, um computador correspondente para o amplificador em tempo real de ácidos nucleicos é definido separadamente e, assim, o usuário faz o programa do amplificador em tempo real de ácidos nucleicos entrar em execução. A lista de trabalho é transferida do instrumento automatizado de purificação e dispensação para o amplificador de ácidos nucleicos em tempo real e, assim, é fornecida automaticamente ao usuário. Os kits de diagnóstico a serem experimentados são selecionados pela execução do programa do amplificador de ácido nucleico através do software gerenciador de análise integrada de ácidos nucleicos em tempo real. Na presente invenção, os controles são automaticamente atribuídos, dependendo do kit de diagnóstico selecionado. O trabalho é realizado pelo usuário de acordo com a lista de trabalho realizada pelo instrumento automatizado de purificação e dispensação de ácido nucleico. Os múltiplos poços são "atribuídos" em conformidade com a ordem na qual as amostras são clicadas. Os kits de diagnóstico são carregados em conformidade com as informações correspondentes. O amplificador de ácidos nucleicos em tempo real é operado. A operação do amplificador de ácidos nucleicos em tempo real leva cerca de 2 a 3 horas. Terminada a operação de s/w (software) do amplificador em tempo real de ácidos nucleicos, um arquivo de resultado correspondente é transmitido para o software gerenciador. Quando a operação é concluída, o estado de operação é automaticamente reconhecido, os resultados são atualizados, e a lista de trabalhos é transferida para um próximo processo através do software "gerenciador" de aparelho de

análise integrada em tempo real de ácidos nucleicos. Todos os resultados são atualizados através da execução da atualização dos resultados por meio do programa "gerenciador". As amostras a serem atualizadas são selecionadas de acordo com os poços dos múltiplos poços. A atualização não é realizada com relação às falhas das amostras, que são retornadas (devolvidas) para um processo correspondente, tal como um processo de separação ou um processo de amplificação. É exibida a janela de "Análise" a fim de mostrar toda a análise atual, que permite ao usuário analisar o estado de amplificação.

O controlador do aparelho para a análise integrada em tempo real de ácidos nucleicos da presente invenção conecta automaticamente cinco programas, ou seja, o banco de dados local da "lista de trabalho", o software gerenciador do aparelho de análise integrada em tempo real de ácidos nucleicos, o software do aparelho automatizado de purificação e dispensação, o software de operação do amplificador em tempo real de ácido nucleico, e o software de análise de amplificador de ácidos nucleicos em tempo real, e, assim, fornece uma série de processo automático. Uma tela relativa à atribuição é fornecida no momento da "atribuição", a fim de evitar erros humanos, e todos os dados são rastreáveis. Os arquivos de log são criados no momento do funcionamento de todas as unidades e instrumentos.

O aparelho para a análise integrada em tempo real de ácidos nucleicos de acordo com a presente invenção pode incluir ainda resultados da análise do armazenamento da unidade de banco de dados 400 dos tubos de reação da

unidade dos kits de diagnóstico respectivos.

Exemplo 2

O Exemplo 2 é direcionado a um método para a detecção de um ácido nucleico alvo utilizando um aparelho para a
5 análise integrada em tempo real de ácidos nucleicos de acordo com a presente invenção, e, doravante, esse será descrito em maiores detalhes.

A presente invenção fornece um método para a detecção de ácidos nucleicos que utiliza um aparelho para a análise
10 integrada em tempo real de ácidos nucleicos, sendo que o método inclui:

1) a separação e a purificação de ácidos nucleicos contidos nas respectivas amostras a partir de várias amostras biológicas contendo amostras-padrão e ácidos
15 nucleicos por uma pluralidade de instrumentos automáticos de purificação e separação 100 e, então, a aplicação da solução assim separada e purificada em um tubo de reação de mistura de reação de amplificação de ácido nucleico;

2) a atribuição de poços em um bloco de circulação de
20 temperatura de múltiplos 210 pela unidade de coluna, de acordo com os tipos de ácidos nucleicos alvo, de modo que o bloco de circulação de temperatura de múltiplos 210, sobre o qual os tubos de reação de mistura de reação de amplificação de ácido nucleico devem ser carregados, e os
25 ácidos nucleicos alvo respectivos separados e purificados pelos instrumentos automáticos de purificação e dispensação 100, correspondam entre si, e o armazenamento de informações nas amostras-padrão e nas amostras biológicas separadas pelos instrumentos automáticos de purificação e
30 dispensação 100, de forma correspondente aos respectivos

poços atribuídos pela unidade de coluna;

3) o carregamento dos tubos de reação preparados na etapa 1) nos respectivos poços em concordância com as informações armazenadas nas amostras biológicas nos respectivos poços dos blocos de circulação de temperatura de múltiplos poços 210 do amplificador em tempo real de ácidos nucleicos; e

4) a amplificação simultânea dos respectivos ácidos nucleicos alvo carregados no bloco de circulação de temperatura 210 do amplificador em tempo real de ácidos nucleicos sob a mesma condição e a realização da análise qualitativa ou análise quantitativa dos ácidos nucleicos alvo respectivos para a pluralidade de amostras biológicas, e, assim, obter os resultados de amplificação.

Na presente invenção, a etapa 2) e a etapa 3) podem ser executadas simultaneamente, ou a etapa 3) pode ser realizada antes da etapa 2).

Na presente invenção, os ácidos nucleicos purificados e dispensados a partir dos instrumentos automatizados de purificação e dispensação 100 podem ser ácidos nucleicos diferentes, ou vários tipos de amostras biológicas podem ser utilizados na separação dos ácidos nucleicos na etapa 1).

Na presente invenção, um controle positivo interno (IPC) pode ser adicionado à amostra biológica, seguida da separação do ácido nucleico, no instrumento automatizado de purificação e dispensação 100, e a eficácia na detecção do ácido nucleico alvo pode ser determinada por determinação, a partir dos resultados da amplificação, de se o ácido nucleico alvo é separado, com êxito, no instrumento

automatizado de purificação e dispensação 100, e da eficiência de amplificação.

Na presente invenção, na etapa 1), o tubo de reação de mistura de reação de amplificação de ácidos nucleicos pode ser preparado através da aplicação da solução de ácido nucleico separada e purificada em um tubo de reação, no qual os componentes necessários para a amplificação de ácidos nucleicos estão contidos em um tipo seco, e da mistura da solução com os componentes.

Uma vez que o kit de diagnóstico da invenção presente compõe-se de uma composição seca, a solução de ácido nucleico separada e purificada é adicionada a essa, para, dessa maneira, preparar diretamente uma mistura. Quando a solução de ácido nucleico separada é adicionada ao kit de diagnóstico em um estado de solução, o volume reativo é aumentado e a concentração de ácido nucleico separada é reduzida.

Na presente invenção, o controle positivo interno pode é uma partícula de vírus mosaico do tabaco quando o ácido nucleico alvo for o RNA.

Na presente invenção, o controle positivo interno é DNA de plasmídeo ou produto de PCR quando o ácido nucleico alvo for o DNA. O produto de amplificação de PCR significa o DNA produzido pela amplificação da PCR.

Na etapa 1), o controle positivo interno poderá igualmente incluir amostras-padrão quantitativas que são adicionadas de acordo com as concentrações conhecidas.

Na etapa 1), um controle negativo (NTC) e um controle positivo (PC) podem ser ainda utilizados como amostras-padrão.

Como a iniciador (primer) e a sonda para a amplificação do controle positivo interno, as sequências representadas pela Tabela 1 abaixo podem ser utilizadas.

Na presente invenção, o controle interno (ou controle positivo interno, IPC) é aplicado a partir de uma etapa de separação e purificação de ácidos nucleicos, e a amplificação é realizada no amplificador de ácidos nucleicos em tempo real após a separação do ácido nucleico a partir da amostra. Isso é utilizado para resolver o problema pelo fato de ser difícil a confirmação de se a causa da amplificação insuficiente de ácido nucleico situa-se num procedimento de purificação ou um procedimento de amplificação. Na presente invenção, o controle positivo interno (IPC) dotado de uma concentração conhecida é adicionado à amostra do procedimento de separação, separado e purificado juntamente com ácido nucleico, e assim, pode se confirmar se a separação é executada apropriadamente no instrumento automatizado de purificação e dispensação de ácido nucleico ou não, bem como se pode facilmente ver se a causa da amplificação insuficiente de ácido nucleico durante o procedimento de amplificação após a separação situa-se na etapa de separação ou na etapa de amplificação. Na presente invenção, um vírus mosaico do tabaco é utilizado como controle positivo interno (IPC). O vírus mosaico do tabaco (TMV), que é um vírus de RNA, pode ser utilizado corretamente como controle positivo interno (IPC) quando um vírus de RNA, tal como o subtipo H1N1 do vírus da influenza A, é um alvo para a detecção.

As vantagens da utilização do vírus mosaico do tabaco (TMV) são de acordo com o que segue. Na técnica anterior, o

controle positivo interno (IPC) não é utilizado junto com o ácido nucleico quando o ácido nucleico tiver de ser separado da amostra, e um tipo específico de RNA é adicionado à amostra de ácido nucleico separada, somente no momento da reação de amplificação de ácidos nucleicos. No entanto, na invenção presente, as próprias partículas de vírus são submetidas à separação, purificação e amplificação, juntamente com o ácido nucleico, desde a etapa de separação da amostra à reação de amplificação de ácidos nucleicos em tempo real e, portanto, eles são úteis no ensaio de eficiência. O vírus mosaico do tabaco (TMV), que é um vírus de planta, permite a purificação de massa e não acompanha os riscos inerentes ao tratamento. Uma vez que um vírus humano e um vírus de planta possuem diferentes "receptores" reativos, os humanos não são infectados pelo vírus da planta. Além disso, pelo fato de o vírus de planta possuir uma relação distante com o vírus humano, uma sequência de bases tem muita ou pouca concordância com uma sequência de bases de um ácido nucleico alvo de humano no momento da preparação de um iniciador (primer) ou sonda ou no momento da reação de amplificação de ácidos nucleicos.

Na presente invenção, o kit de diagnóstico é composto por um controle positivo interno (IPC), um iniciador (primer) correspondente ao ácido nucleico alvo amplificado, uma etiqueta detectável para a detecção do ácido nucleico alvo, e um tampão, que são fornecidos na mesma quantidade dentro de um tubo de reação da unidade. Pode ser utilizada uma tira de 8 poços como o tubo de reação de unidade. Além disso, os reagentes para a amplificação de ácido nucleico, dentro do tubo de reação de unidade, são caracterizados

para formação em um tipo seco.

Na presente invenção, o resultado da amplificação, a partir do qual o controle positivo interno (IPC) é adicionado à amostra biológica a fim de separar e
5 identificar os ácidos nucleicos em tempo real no amplificador de ácido nucleico em tempo real 200, pode ser confirmado a partir da separação ou não-separação do ácido nucleico obtido a partir do instrumento automatizado de purificação e dispensação 100 e do procedimento de
10 amplificação da de realização da amplificação simultânea sob a mesma condição, utilizando o amplificador de ácido nucleico em tempo real 200.

O aparelho para a análise integrada em tempo real de ácidos nucleicos de acordo com a presente invenção pode
15 simultaneamente amplificar os ácidos nucleicos separados a partir da pluralidade de instrumentos automatizados de purificação e dispensação simultaneamente através do amplificador em tempo real de ácidos nucleicos 200.

Além disso, a presente invenção inclui ainda a coleta
20 de informações sobre os ácidos nucleicos alvo a serem detectados a partir dos ácidos nucleicos respectivos simultaneamente amplificados.

Por exemplo, os ácidos nucleicos podem ser separados do sangue, urina, saliva, células e similares através de
25 procedimentos diferentes, mas os ácidos nucleicos separados desses podem ser amplificados simultaneamente em um único amplificador. Na presente invenção, os ácidos nucleicos são separados por vários instrumentos automatizados de dispensação e purificação. Os ácidos nucleicos são
30 respectivamente separados do sangue, urina, saliva e

amostras de saliva pelos três instrumentos automatizados de purificação e dispensação. Os ácidos nucleicos separados podem ser aplicados na detecção simultânea de AIDS, hepatite B, hepatite C, malária, tuberculose e doenças venéreas, utilizando, portanto, os kits de diagnóstico.

A fim de detectar simultaneamente as causas dessas doenças pelo amplificador em tempo real de ácidos nucleicos, múltiplos poços no bloco de circulação de temperatura de múltiplos poços podem ser particionados pela unidade de coluna, e, dessa maneira, atribuir um poço específico para a detecção. Por exemplo, as colunas do bloco de circulação de temperatura de múltiplos poços são atribuídos de forma que a primeira coluna é atribuída para a AIDS, uma segunda coluna para a hepatite B, uma terceira coluna para a hepatite c e uma quarta coluna para doenças venéreas, e, em seguida, são definidas as respectivas condições de amplificação da mesma maneira. Então, os kits de diagnóstico contendo os ácidos nucleicos separados são respectivamente carregados em poços atribuídos no bloco de circulação de temperatura de múltiplos poços, e, então, a reação de amplificação é realizada. A fim de definir as condições de reação da amplificação da mesma maneira, os valores de T_m das condições de reação dos kits de diagnóstico respectivos são determinados da mesma maneira ou de forma similar. A amplificação simultânea é realizada no amplificador de ácido nucleico de 96 poços sob a mesma condição de reação da PCR, no qual o iniciador (primer) ou sonda é definida para possuir o mesmo valor de T_m . Como resultado, a conveniência pode ser melhorada e o tempo de detecção pode ser encurtado. Sobretudo, o erro de tempo,

que é provocado por detecção sequencial de vários tipos de alvos um por um, pode ser reduzido. Além disso, um procedimento de identificação pode ser facilmente realizado, uma vez que uma pluralidade de DNAs ou RNAs alvo
5 são simultaneamente detectados na mesma condição pelo amplificador em tempo real de ácido nucleico em vez de detectar apenas um tipo de patógeno alvo de uma vez. Assim, vários patógenos podem ser simultaneamente identificados em um período curto, pela separação de ácidos nucleicos de
10 vários tipos de amostras derivadas de uma pessoa ou amostras derivadas de várias pessoas e pela detecção simultânea de vários ácidos nucleicos a partir desses ao mesmo tempo. Na presente invenção, os itens de teste de um patógeno específico são atribuídos pela unidade de coluna
15 do bloco de circulação de temperatura de múltiplos poços.

Um procedimento de separação e purificação dos ácidos nucleicos a partir das amostras biológicas, utilizando a pluralidade de instrumentos automatizados de purificação e dispensação 100 de acordo com a presente invenção está de
20 acordo com o descrito a seguir. Na presente modalidade exemplar, o instrumento totalmente automatizado de extração de ácido nucleico ExiPrep™ da empresa Bioneer Company foi adotado e utilizado como instrumentos automatizados de purificação de ácidos nucleicos, e o kit de extração
25 ExiPrep™ da empresa Bioneer Company foi modificado e utilizado como um kit de purificação de ácidos nucleicos.

Na presente invenção, o kit de purificação de ácidos nucleicos do instrumento automatizado de purificação e dispensação é composto de um conjunto de cartuchos no quais
30 os tampões utilizados na extração de ácidos nucleicos de

várias amostras biológicas contendo ácidos nucleicos são incluídos, e um conjunto de consumíveis plásticos utilizados na purificação. O conjunto de cartuchos é composto de cartucho I e cartucho II. O cartucho I contém protease para a proteólise intracelular, uma solução de lise para a lise celular, partículas magnéticas de sílica para ligação do ácido nucleico eluído, e uma solução de ligação para a ligação de ácido nucleico eluído e das partículas magnéticas de sílica. O cartucho II contém pelo menos um tipo de solução de lavagem para a lavagem de materiais com exceção do ácido nucleico ligado nas superfícies das partículas magnéticas de sílica e uma solução de eluição para a separação eficiente dos ácidos nucleicos das superfícies das partículas magnéticas de sílica. O conjunto de consumíveis plásticos é composto de uma ponta de filtro descartável utilizada no transporte e na transferência de vários tipos de tampões, um tubo de reação utilizado em um procedimento de lise celular pela protease, e um tubo de eluição para o armazenamento do ácido nucleico finalmente purificado.

O cartucho do kit de purificação de ácido nucleico é um cartucho de múltiplos poços, e um cartucho de 96 poços pode ser preferivelmente utilizado. O kit de DNA/RNA viral ExiPrep™ da empresa Bioneer Company pode ser adotado e utilizado como o kit de purificação de ácidos nucleicos a fim de separar o RNA da nova influenza A (H1N1). Um processo de extração de RNA viral compõe-se de um procedimento de pré-tratamento de amostra, um procedimento de adição de um controle positivo, um controle negativo, um controle positivo interno (IPC), e amostra, e um

procedimento de extração de ácidos nucleicos utilizando o instrumento automatizado de purificação e dispensação. Uma vez que o ácido nucleico extraído é automaticamente misturado com um kit de diagnóstico para o RT-PCR em tempo real, o RNA viral deve ser manualmente inserido no kit de diagnóstico, após a extração do ácido nucleico.

Para um exemplo específico, um procedimento de purificação de ácido ribonucleico viral a partir de um vírus da nova influenza A através da utilização do instrumento automatizado de purificação e dispensação e o kit de purificação nucleico do aparelho para a análise de ácido nucleico em tempo real é de acordo com o descrito a seguir.

A amostra é colhida a partir da cavidade oral e da cavidade nasofaríngea utilizando um cotonete. Um tubo para o armazenamento de amostra, no qual o meio de transporte de vírus (VTm) está contido, é fortemente agitado por 1 minuto através do uso de um agitador de vórtice (Vortex), e, assim, permite a retirada eficaz do cotonete para o meio de transporte de vírus, antes da utilização da amostra na purificação do ácido nucleico. A solução (PBS, salina normal, meios de transporte, ou similares) é bem misturada durante um minuto ou mais utilizando o agitador de vórtice de modo que o vírus seja retirado do cotonete para a solução. 1 ml de uma solução de amostra misturada é transferido para um tubo de ensaio de 1,5 ml, seguido de separação centrífuga a 13.000 rpm por 5 a 10 segundos. 200 µl de um sobrenadante são retirados para serem utilizados na extração de RNA viral.

O instrumento automatizado de purificação e

dispensação é ligado, e, assim, é inicializado. O software gerenciador de aparelho de análise integrada em tempo real de ácidos nucleicos é em grande parte dividido em dois, ou seja, uma parte de controle do instrumento automatizado de purificação e dispensação de ácido nucleico e uma parte de controle do amplificador em tempo real de ácido nucleico. A fim de extrair o RNA viral, um kit de diagnóstico a ser testado é selecionado, clicando em uma imagem do instrumento automatizado de purificação e dispensação, que está do lado esquerdo em uma tela principal do software. Quando uma caixa de entrada de kit de diagnóstico é clicada e um kit de diagnóstico para a detecção da nova influenza é selecionado, o tipo de ácido nucleico a ser extraído é selecionado automaticamente. O tipo de amostra de acordo com o tipo de amostra do paciente é inserido na janela de entrada do "tipo de fonte da amostra". Quando o tipo da amostra é inserido, a janela pop-up para inquirir o estado do cartucho é exibida automaticamente. Confirma-se se há, ou não, a presença de poços utilizados, com referência ao cartucho de tampão I, e quando os poços utilizados estão presentes, poços utilizados são marcados por meio de clique, de modo que eles não sejam mais utilizados. Os poços residuais do cartucho I são automaticamente marcados para o controle negativo e o controle positivo. Um único NTC e um único PC são definidos como base, e dois NTPs e dois PCs podem determinados de maneira alterável. Se houver uma lista ser testada novamente, a lista testada de novo é exibida nessa etapa, e se botões numéricos para a amostra ser novamente testada na lista forem selecionados, os poços são sequencialmente "atribuídos". Uma caixa de "nome da

amostra" é clicada, e informações de amostra são nela inseridas utilizando um leitor de código de barras ou um teclado. A fim de aplicar as informações inseridas no aparelho para a análise integrada de ácidos nucleicos em tempo real, o botão "aplicar" é clicado.

200µl de controle positivo interno (IPC) são inseridos em cada um dos poços na primeira coluna e na segunda coluna do cartucho I do kit de purificação de ácidos nucleicos, sobre a placa de trabalho. 200µl de um controle positivo (PC) são colocados dentro do poço em um local do controle positivo (PC), ou seja, no local A-1 do cartucho I, e 200µl da água destilada terciária (controle negativo, NTC) tratados com DEPC são colocados dentro do poço no local B-1 do cartucho I, correspondentemente aos teores inseridos no aparelho para a análise integrada de ácido nucleico em tempo real. 200µl da amostra do paciente são colocados em cada um dos outros poços nos locais de C-1 a o H-1 e A-2 a H-2. Aqui, as amostras de ácido nucleico certamente precisarão ser colocadas no cartucho correspondentemente aos locais inseridos a partir do aparelho para a análise integrada em tempo real de ácidos nucleicos. As pontas de filtro descartáveis e os tubos de reação de unidade são carregados nas prateleiras dentro dos instrumentos automatizados de purificação e dispensação respectivos, correspondentemente aos locais dos poços do cartucho, no qual o material padrão, a água destilada terciária tratada com DEPC, e as amostras dos pacientes estão contidos, respectivamente.

Além disso, o tubo de eluição e o kit de diagnóstico para o teste de diagnóstico da nova influenza, nos quais se

encontram os ácidos nucleicos, são carregados no bloco de congelamento. O conjunto de cartuchos preparado e o conjunto de consumíveis plásticos são carregados em cada um dos instrumentos automatizados de purificação e dispensação. Então, o botão "EXECUTAR" no software gerenciador de aparelho de análise integrada em tempo real de ácidos nucleicos é clicado a fim de operar os instrumentos automatizados de purificação e dispensação, purificando, assim, o RNA do vírus na nova influenza a partir das amostras dos pacientes. Quando a purificação de ácidos nucleicos é concluída, o tubo de eluição para o armazenamento de ácidos nucleicos e o kit de diagnóstico para o teste de diagnóstico são retirados do bloco de congelamento. O tubo de eluição para o armazenamento de ácido nucleico é tampado utilizando uma tampa de tubo fornecida e, então, armazenado a uma temperatura de -80°C... Para o kit de diagnóstico, uma extremidade superior de um tubo de tiras é selada utilizando um filme óptico de adesivo óptico e, em seguida, transferida para o amplificador de ácidos nucleicos. Em seguida, a RT-PCR em tempo real é executada no kit de diagnóstico. Quando a extração é concluída, 50uL da solução de extração de ácidos nucleicos estão contidos em cada tubo de eluição e o tubo de reação para o kit diagnóstico dentro do instrumento de purificação e dispensação de ácidos nucleicos.

Na modalidade exemplar presente da presente invenção, um Bloco Térmico Quantitativo em Tempo Real Exicycler™ 96 foi adotado e utilizado como o amplificador de ácidos nucleicos em tempo real, e o kit AccuPowerDiagnostics da empresa Bioneer foi adotado e utilizado como o kit de

diagnóstico.

Os resultados da amplificação a partir do amplificador em tempo real de ácidos nucleicos são obtidos pelo procedimento a seguir. Em primeiro lugar, uma figura do amplificador de ácidos nucleicos em tempo real é clicada no aparelho para a análise integrada de ácidos nucleicos em tempo real. As listas de amostras cuja extração for concluída são armazenadas de acordo com os kits, no software gerenciador. Uma lista correspondente é selecionada através no clique no botão "Obter a Lista de Amostras".

Aqui, é exibida a janela pop-up para a determinação de qual local do bloco de circulação de temperatura de múltiplos poços o kit de diagnóstico é selecionado. As amostras são atribuídas aos múltiplos poços, através da seleção das caixas de verificação (checkbox) da lista de amostras de acordo com as tiras do tubo de reação. Quando cada poço é selecionado, a localização de cada kit de diagnóstico é determinada. Aqui, os locais desejados dos kits de diagnóstico são selecionados enquanto uma figura de múltiplos poços é exibida na tela.

Considerando o número de tubos de tiras do kit de diagnóstico, um número de coluna e um número de fileira são selecionados a fim de determinar onde os tubos de tiras são carregados no bloco de circulação de temperatura. Por exemplo, se o kit de diagnóstico no qual os ácidos nucleicos são dispensados for um tipo de 8 tiras, o kit de diagnóstico é posicionado no centro do bloco de circulação de temperatura de múltiplos poços do amplificador de ácido nucleico através do clique no botão para um local

correspondente de 96 poços. Quando a seleção é concluída, é exibida uma caixa na qual um nome de dados é inserido. Quando um nome desejado é inserido e o botão é clicado, é gerada uma lista de trabalho a ser amplificada por ácidos nucleicos.

Os kits de diagnóstico são carregados no bloco de circulação de temperatura de múltiplos poços do amplificador em tempo real de ácidos nucleicos correspondentemente às localizações "atribuídas", e, em seguida, o software do amplificador de ácidos nucleicos em tempo real é executado. Quando a operação do amplificador de ácidos nucleicos em tempo real é concluída, os dados dos resultados são transmitidos para o software gerenciador. No aparelho para a análise integrada de ácidos nucleicos em tempo real, o botão "resultado da atualização" é selecionado clicando no botão "tap" em uma parte do menu do software gerenciador do controlador e, assim, os resultados da PCR são trazidos. Os resultados são trazidos através da seleção do botão "lista de trabalho", que é gerado na parte superior esquerda de uma janela aberta recentemente. Os valores do resultado são confirmados em um formato de arquivo do excel a fim de que os kits de diagnóstico sejam "atribuídos". Os gráficos dos resultados de acordo com as respectivas amostras podem ser analisados em conexão com um programa de análise a eles conectado. Para as amostras, cujos resultados são confirmados, a atualização dos resultados é realizada no programa gerenciador. Caso contrário, um novo teste a partir da etapa de amplificação, ou um novo teste a partir da etapa de purificação é selecionado, e, assim, uma lista de novo teste é criada.

Mais especificamente, as prateleiras (racks) respectivas do tubo de reação, uma prateleira de ponta descartável, uma prateleira de tubo de eluição e um cartucho I de tampão são carregados em uma placa do
5 instrumento automatizado de purificação e dispensação preparado dentro de um gabinete de segurança biológica (BSC). Os tubos de reação, as pontas de filtro descartáveis, os tubos de eluição e os kits de diagnóstico são colocados em prateleiras respectivamente,
10 correspondentemente ao número de amostras. Os orifícios são formados nos filmes de vedação do cartucho I de tampão e do cartucho II de tampão utilizando um "furador" (hole-punch) fornecido, correspondentemente ao número de amostras e ao número de controles positivos (PCs) e controles negativos
15 (NTCs), que devem ser utilizados como amostras-padrão. Com referência à Fig. 5, 200µl de controle positivo interno das plantas (IPC) são colocados em cada poço, correspondente aos locais onde as amostras, os controles positivos (PCs) e os controles negativos (NTCs) são inseridos. 200µl de água
20 destilada tratada com DEPC são colocados em cada um dos poços de controle negativo (NTC). 200µl de controle positivo (PC) são adicionados em cada um dos poços para o controle positivo (PC). 200µl de amostras de paciente preparados acima são colocados em cada um dos poços do
25 cartucho. Após os poços serem fechados com tampas acrílicas transparentes, os cartuchos são colocados no instrumento automatizado de purificação e dispensação.

O instrumento automatizado de purificação e dispensação é operado a fim de levar um programa ao teste
30 da nova influenza. Após a confirmação do instrumento a ser

utilizado, os poços, nos quais o controle positivo (PC) e o controle negativo (NTC) estão respectivamente contidos, são marcados. A respeito dos poços para as amostras com exceção dos poços para o controle positivo (PC) e os poços para o
5 controle negativo (NTC), as informações de pacientes (sexo, idade, parte responsável (encarregada) e similares) para as amostras são inseridas por um leitor de código de barras ou manualmente. O botão "EXECUTAR" é pressionado a fim de iniciar a extração do RNA Viral.

10 Após a conclusão da extração de RNA Viral, quando a "porta" é aberta e a "Placa Base" é puxada, a prateleira do tubo de eluição, sobre a qual os tubos de eluição e o kit de diagnóstico são carregados, pode ser vista.

Lá, há 50 μ l do RNA viral extraído em cada tubo eluição
15 e no kit de diagnóstico. Portanto, não há nenhuma necessidade de adicionar o RNA ou o destilado tratado com DEPC. O kit de diagnóstico necessário para o teste da nova influenza pode ser retirado da prateleira de tubo de eluição e diretamente aplicado na RT-PCR em tempo real
20 utilizando o amplificador de ácidos nucleicos em tempo real. O RNA viral contido no tubo de eluição é utilizado no momento do re-teste. O RNA viral extraído é armazenado a uma temperatura de -80°C até ser utilizado, se possível. A prateleira do tubo de eluição é mantida a uma temperatura
25 de 4°C a fim de armazenar o ácido nucleico extraído.

Um reagente de análise de amplificação de ácidos nucleicos contido no kit de diagnóstico utilizado na presente invenção inclui um reagente de análise que contém todos os componentes necessários para a amplificação de
30 ácido nucleico alvo. O reagente de análise constitui-se em

um tipo "pronto-para-uso" a fim de detectar em tempo real o DNA ou RNA alvo dentro da amostra qualitativa ou quantitativamente, utilizando o amplificador de ácidos nucleicos em tempo real.

5 O reagente de análise no kit de diagnóstico utilizado na presente invenção inclui um tampão para a reação, $MgCl_2$, quatro tipos de dNTP, polimerase, iniciador (primer) e etiqueta de detecção, que são necessários para a amplificação de ácido nucleico, e seletivamente um
10 estabilizador. O reagente de análise é feito em um estado seco. A etiqueta de detecção é caracterizada por ser um corante fluorescente ou uma sonda etiquetada com um corante fluorescente. Além disso, de acordo com a presente invenção, uma composição para o reagente de análise é
15 preferencialmente secada através de liofilização, secagem a vácuo, secagem por aquecimento, secagem sob pressão reduzida, ou similares.

Como o kit de diagnóstico utilizado na presente invenção, por exemplo, o kit de PCR AccuPower da empresa
20 Bioneer pode ser adotado e utilizado. Um iniciador (primer), uma sonda fluorogênica duplamente etiquetada, DNA polimerase, dNTPs, e um estabilizador, que são para a amplificação de uma parte específica de um genoma da nova influenza A (H1N1) e o vírus da Influenza A, estão
25 incluídos na nova pré-mistura New Inf A(H1N1) & Inf A Premix da empresa Bioneer. O produto de amplificação é confirmado pela medição de fluorescência ligada a uma sonda específica durante ciclos térmicos. A amplificação de acordo com o ciclo do produto da PCR é medido em tempo
30 real, através da medição de um corante repórter retirado da

sonda de medição. Além disso, os controles positivos da nova influenza A H1N1 & Influenza A (New Inf A H1N1 & Inf A Positive controls) estão contidos no kit de diagnóstico para a análise qualitativa das amostras.

5 No caso onde o reagente da análise de amplificação de ácido nucleico é utilizado em uma etapa de amplificação, o ácido nucleico separado é colocado no tubo de tiras no qual o está contido o reagente de análise. Aqui, o reagente de RNA de controle positivo da nova influenza A H1N1 &
10 influenza A e o reagente de RNA de controle positivo interno (IPC) são adicionados no tubo. Uma solução de mistura é preparada pela mistura de água destilada tratada com DEPC e RNA de controle positivo interno (IPC) em quantidade calculada, e 45µl da solução de mistura são
15 dispensados em cada poço da tira.

A tira, na qual é concluída a dispensação de todos os reagentes e do RNA, é fechada com uma tampa ou selada com um filme de vedação, misturando plenamente, assim, os teores da solução de mistura. Aqui, um procedimento de
20 rotação é de preferência executado utilizando o Exispin™ (Cat. Nº: A-7040, Bioneer Co., Coreia), após a mistura. Então, a tira é carregada no bloco de circulação de temperatura de múltiplos poços do amplificador de ácidos nucleicos em tempo real (bloco térmico quantitativo em
25 tempo real Exicycler™ 96, empresa Bioneer Company), e, em seguida, o amplificador de ácidos nucleicos em tempo real é executado.

Um interruptor, que é disposto em uma parte inferior de uma superfície traseira do amplificador em tempo real de
30 ácidos nucleicos (Exicycler™ 96), é ativado. Quando o

bloco de circulação de temperatura de múltiplos poços de 96 poços é movido na frente da máquina, as tiras ou placas da PCR são inseridas de acordo com a direção dos poços do bloco de circulação de temperatura de múltiplos poços.

5 Quando o botão "porta" é novamente pressionado, o bloco de circulação de temperatura multi-paredes de 96 poços (bloco térmico) é movido interiormente. Um programa de operação (executa o ícone ExiDiagnosis) do Exicycler™ 96 é executado. A fim de executar um método de operação
10 necessário para a reação da PCR, é clicado o botão "Experimento de Projeto-Arquivo" na parte superior.

Então, quando é exibida a "Selecionar a Janela do Kit de Diagnóstico", o botão "Kit da PCR em Tempo Real da Nova Inf A e InfA" é selecionado. Quando a seleção de
15 "Selecionar Kit de Diagnóstico" for concluída, um arquivo do excel, no qual as informações sobre a posição da tira dentro do bloco de circulação de temperatura de múltiplos poços de 96 poços são inseridas, é selecionado e aberto.

Quando toda a seleção estiver concluída, uma janela de
20 exibição de informações de protocolo e placa, através da qual as condições de reação PCR adequadas para os kits e as informações de posição selecionadas podem ser exibidas, é confirmada.

Quando o botão "Executar tap" é clicado, uma nova
25 janela, na qual um nome de arquivo para o armazenamento de resultados pode ser inserido, é exibida. Quando informações sobre a data e amostra do experimento são inseridas e o botão "OK" é pressionado, a PCR é iniciada. Os resultados podem ser confirmados a partir do programa de análise,
30 utilizando o nome do arquivo de entrada.

Os resultados de amplificação a respeito da amplificação de ácidos nucleicos são analisados por meio do programa de análise Exicycler™ 96. O "Arquivo de dados da PCR (.exe3)" a ser analisado é selecionado. A análise
5 personalizada é possível através da 'Subtração de linha de base (modo manual)', na tela do "Gráfico de gripe" do resultado de amplificação, e os resultados da análise básica provenientes do programa de análise podem ser confirmados utilizando o botão "auto escala". No caso do
10 controle negativo (NTC), os RNAs de Nova Inf A & Inf A não são adicionados. Portanto, valores fluorescentes FAM e Texasred não são medidos. No caso do RNA de controle positivo interno (IPC), os valores fluorescentes TAMRA precisam ser medidos ao longo de todos os poços.

15 Quando a PCR é realizada, os poços predeterminados são atribuídos dentre poços, e, por exemplo, A1 e B1 são atribuídos para os controles negativos (NTCs) e C1 e D1 são atribuídos aos controles positivos (PCs). O controle positivo e o controle negativo são utilizados como
20 amostras-padrão. Se os dois controles não atenderem à referência, uma mensagem de erro pode ser gerada no programa de análise. Na presente invenção, o software funciona para a análise "Auto" (automática) no momento da análise diagnóstica. Os resultados são analisados
25 automaticamente, e os resultados analisados são exibidos.

[Exemplo 3]

O Exemplo 3 é direcionado à detecção simultânea de controles positivos internos e diversas amostras utilizadas na separação e na purificação de ácidos nucleicos, em um
30 método para a detecção de um ácido nucleico alvo utilizando

o aparelho para a análise integrada em tempo real de acordo com a presente invenção.

(1) Projeto e aplicação do iniciador (primer) e sonda de controle positivo interno de plantas

5 Para o controle positivo interno de planta (IPC), uma sequência de base foi selecionada entre as sequências de base n° 4903 e n° 5709 (gene da proteína de movimento, MP) e entre as sequências de base n° 5712 e n° 6191 (gene da proteína capsidial, CP) de um RNA de genoma (banco de
10 genoma GeneBank n° de Acesso NC001367) de um vírus mosaico do tabaco (TMV) de modo a conter um comprimento de 18 a 28 bp e um valor de Tm de 55°C para 62°C e, assim, a sequência de base selecionada foi utilizada como um iniciador (primer) direto e um iniciador (primer) reverso.

15 Além disso, qualquer sequência de base foi selecionada a partir das sequências de base de modo a possuir um comprimento de 19 a 30 bp e um valor de Tm de 67°C a 72°C, e a sequência de base selecionada foi utilizada como sonda [tabela 1]. Valores de TM são verificados utilizando o
20 programa de Iniciador Plus.

[tabela 1]

N°		Iniciador Direto	Iniciador Reverso	Sonda TaqMan (Direto)
1	MP1	AGATTTCAGTTCAAGGTGTTTC	GAAACCCGCTGACATCTT	ACGCGATGAAAAACGTCCTGGCAAGT
2	MP2	TCAGTTCAAGGTGTTCC	GAGAAGCGGACAGAAACC	ACGCGATGAAAAACGTCCTGGCAAGT
3	MP3	ACAATTGCAGAGGAGGTG	TGGGAACGACCTTGAAC	CTGGTGGACAAAAGGATGGAAGAGC
4	CP1	AAGCTCGAACTGTGTTTC	CTAACAGTCTGTGACTA	AGACAATTCAGTGAGGTGTGGAAACCTT
5	CP2	GGTGTGGAAACCTTCAC	CAACTTCTATTATCTATTCTAGTGTG	AGTGACTTTAAGGTGTACAGGTACAATGC
6	CP3	TGACTTTAAGGTGTACAGG	CGTCTACTCTACGAGTAG	ATAGAAGTTGAAATCAGCCGAACCCC

Um procedimento para descobrir as combinações de iniciador (primer) apropriado foi realizado combinando o

iniciador (primer) do vírus mosaico do tabaco (TMV) de acordo com os grupos e utilizando o SYBR Green (reagente de ácido nucleico para a detecção do ácido nucleico) e o bloco térmico quantitativo ExicyclerTM (empresa Bioneer, Coréia)

5 como um amplificador quantitativo em tempo real.

Seis conjuntos combinados de iniciadores do vírus mosaico do tabaco (TMV), um reagente para corar os ácidos nucleicos, água destilada (DW) e um modelo de vírus mosaico do tabaco foram adicionados e, em seguida, submetidos à RT-PCR em tempo real. Esses foram submetidos a 45 ciclos de 95°C por 10 minutos para a desnaturação, 95°C por 20 segundos e 55°C por 30 segundos. Como ciclos de PCR respectivos foram realizados, os valores fluorescentes amplificados foram medidos consecutivamente uma vez a cada 10 ciclo após a reação a 55°C para cada ciclo de 30 segundos.

Como resultado, os conjuntos de iniciadores 1, 2 e 3 (conjuntos de MP 1, 2 e 3) têm uma taxa mais elevada de PCR do que os conjuntos (grupos) de iniciadores 4, 5 e 6 (conjuntos de CP 1, 2 e 3), e, assim, os conjuntos de MP 1, 2 e 3 foram selecionados.

Em um experimento, um procedimento de seleção de conjunto de sondas apropriado de sonda foi ainda realizado utilizando uma sonda de detecção de ácidos nucléicos de sequência específica em vez do reagente não específico de ácido nucleico de coloração. 5µl de tampão 10x, MMLV 600U, unidade Taq 7.5, 3µl dNTP 20 mM, estabilizador, um iniciador (primer) da concentração melhorada (15 p), uma sonda e similares, e o RNA do vírus mosaico do tabaco (TMV) extraído de folhas doentes adicionadas, alcançaram um 25 volume total de 50µl dentro de um tubo, e uma RT-PCR em 30

tempo real foi realizada. Este material resultante foi submetido à RT-PCR a 45 °C durante 15 minutos, seguido por 45 ciclos de 95°C por 10 minutos para desnaturação, 95°C por 20 segundos e 55°C por 30 segundos.

5 Dentre os conjuntos 1, 2 e 3 de iniciador e sonda do vírus mosaico do tabaco, o conjunto de Conjunto de Sondas 1 (MP 1) apresentou a melhor eficiência de amplificação de PCR e Conjunto de Sondas 3 (MP 3) e Conjunto de Sondas 2 (MP 2) haviam seguido o Conjunto de Sondas 1 (MP 1) nessa

10 ordem.

O experimento de aplicação de RT-PCR em tempo real do modelo padrão foi realizado utilizando os Conjunto de Sondas 1 e 3 dos conjuntos de sondas, utilizando o RNA do vírus mosaico do tabaco (TMV) como o RNA de controle

15 positivo interno na solução de mistura de RT-PCR tendo a composição acima, e adicionando o RENA da nova influenza como modelo. Os resultados do experimento confirmaram que, apesar dos Conjunto de Sondas 1 (MP1) e 3 (MP3) terem reagido com 1x10⁶ do RNA de controle positivo interno

20 cópia, não houve nenhuma grande efeito sobre a amplificação do modelo de RNA da nova influenza e a amplificação dos controles positivos internos também foi bem realizada de forma independente.

(2) Preparação do controle positivo interno da planta,

25 Aplicação desse durante o procedimento de extração de ácido nucleico, e Aplicação da RT-PCR em tempo real

A fim de preparar um controle positivo interno de planta passível de uso com outras amostras biológicas, o vírus mosaico do tabaco foi cultivado. B100 a 200 sementes

30 do tabaco *Nicotiana tabaccum* cv. Samsun (disponibilizadas

por um laboratório de vírus de planta da Administração de Desenvolvimento Rural) foram semeadas, e, 10 dias depois, os brotos jorraram. Após 10 dias a partir desse, cada objeto foi transplantado para um pequeno vaso de flores e, então, foi ainda cultivado por 10 dias. As folhas de doença do vírus mosaico do tabaco (disponibilizadas por um laboratório de vírus de planta da Administração de Desenvolvimento Rural) foram colocadas num morteiro, e então moídas com 0,01 M de tampão fosfato (pH 7,2), preparando, assim, um suco. O suco preparado foi coberto nas folhas de tabaco sobre as quais o carborundo foi aspergido e, assim, a inoculação de TMV realizou-se através da lesão das folhas.

Após 10 dias de inoculação, as marcas de mosaico, a distorção de folha e similares foram observados nas folhas de tabaco. O rendimento de reprodução do vírus mosaico do tabaco foi aumentado através de um crescimento adicional das folhas de tabaco por cerca de 20 dias. Em seguida, 30 g de folhas de doença de TMV foram colhidas, e os experimentos para a purificação das partículas de vírus foram realizados.

Especificamente, 30g de folhas da doença do vírus mosaico do tabaco (TMV), 90 ml de 0,1 M de tampão fosfato (pH7,2) e 0,6 ml de β -mercaptoetanol foram colocados em um misturador, seguido de moagem das folhas e filtragem com gaze, e, em seguida, 12 ml de n-butanol foram adicionados, seguido por agitação por 1 hora e 30 minutos a 4°C. A mistura resultante foi submetida à separação centrífuga de 8000 rpm em 4°C durante 20 minutos, e, então, apenas o sobrenadante foi colhido, e então filtrada com tecido de

fibra de Mira. PEG tendo 8% do volume do líquido sobrenadante e 0,1 M de NaCl foram adicionados, seguido por agitação durante 3 horas (mantida a 4°C).

A mistura assim obtida foi submetida à separação centrífuga de 10000 rpm a 4°C durante 20 minutos e, em seguida, o sobrenadante foi removido e o pallet (paleta) foi bem dissolvido em 7,5 ml de 0,1 m de tampão fosfato. O material resultante foi novamente submetido à separação centrífuga de 10000 rpm a 4°C durante 20 minutos, e, em seguida, o sobrenadante foi retirado e submetido à separação centrífuga de 28000 rpm a 4°C por 2 horas e 30 minutos. Após a remoção do líquido sobrenadante, o pallet residual é dissolvido em água destilada na qual 300µl de DEPC foram adicionados, extraíndo, assim, as partículas de vírus mosaico do tabaco (TMV). As partículas extraídas foram confirmadas por imagens de microscopia eletrônica e SDS-PAGE. A concentração do vírus foi quantificada pela medição da absorvância (260nm) com um espectrômetro de UV (produto de empresa Shimazu Company, Japão) e utilizando a seguinte equação.

[absorvância a 260nm/ 3,09 (coeficiente de absorvância TMV)] x fator de diluição

Com base no resultado da quantificação da concentração, o número de cópia de RNA foi calculado pela seguinte equação.

$6,02 \times 10^{23} \times \text{concentração (concentração medida por um espectrômetro de UV, mg/ml)} / 6395 \text{ (tamanho do genoma do vírus mosaico do tabaco, bp)} \times 330$

Foi realizado um experimento de seleção da concentração ideal a fim de aplicar as partículas do vírus

mosaico do tabaco extraídas do experimento acima mencionado a partir da etapa de purificação, que é uma etapa de extração de RNA. Em primeiro lugar, 200 μ l de uma solução de diluição de partículas do vírus mosaico do tabaco foram utilizados para a extração de 50 μ l através de um instrumento de separação e purificação de ácidos nucleicos (ExiPrep™, produto da empresa Bioneer Company, Coreia), e essa foi utilizada como RNA de controle positivo interno. 1 μ l do RNA de controle positivo interno foi colocado em um tubo no qual 5 μ l de tampão 10x, MMLV 600U, 7,5 unidade de Taq, 3 μ l de 20 mM dNTP, estabilizador, um iniciador (primer) da concentração otimizada (15 p), uma sonda, e similares, e o RNA da nova influenza como um modelo padrão e água destilada foram adicionados, atingindo, assim, o volume total de 50 μ l. Em seguida, a RT-PCR em tempo real foi realizada no amplificador de ácidos nucleicos. Este material resultante foi submetido à RT-PCR a 45 °C durante 15 minutos, seguido por 45 ciclos de 95°C por 10 minutos para desnaturação, 95°C por 20 segundos e 55°C por 30 segundos.

Como resultado, confirmou-se que 2 $\times$ 10⁸ a 2 $\times$ 10⁹ /200 μ l do RNA de controle positivo interno por uma solução de reação exibiram a máxima eficiência de PCR no momento da separação e da purificação.

Em seguida, as partículas mosaicas do tabaco extraídas junto com as amostras da nova influenza são aplicadas em experimentos após a etapa de extração de RNA para a RT-PCR em tempo real e, então, comparadas com o controle positivo interno existente utilizado (controle positivo interno contido no kit de diagnóstico AccuPower da Bioneer Company

(plasmídeo de gene DVL de rato)). No momento da extração de RNA, 2×10^8 a 2×10^9 cópia/ $20 \mu\ell$ do RNA em conformidade com as concentrações selecionadas pelos experimentos acima foram misturados com $200 \mu\ell$ de amostra da nova influenza, e eles
5 são separados e extraídos pelo instrumento de purificação e dispensação de ácidos nucleicos. No momento da RT-PCR em tempo real no amplificador de ácido nucleico, o iniciador (primer) e conjuntos de sondas 1 e 3 (MP1 e MP3) selecionados no Exemplo 2 foram usados.

10 O resultado do experimento confirmou que a concentração ideal das partículas de vírus mosaico do tabaco no momento da extração de RNA é de 2×10^8 de cópia/ $20 \mu\ell$. Por conseguinte, é preferível a mistura de $20 \mu\ell$ de 1×10^7 de cópia/ $\mu\ell$ da partícula do vírus mosaico do
15 tabaco com $200 \mu\ell$ da amostra na etapa de purificação. Além disso, foi mostrado que o Iniciador (primer) e o Conjunto de sondas (MP 1) possuem maior eficiência na amplificação do controle positivo interno do TMV.

Além disso, quando esse resultado foi comparado com os
20 resultados de reação de controle positivo interno existentes em relação à mesma amostra da nova influenza, confirmou-se que, apesar de o vírus mosaico do tabaco ter sido extraído junto com a amostra e serem submetidos à reação, não houve nenhum grande efeito sobre a amplificação
25 do modelo de RNA da nova influenza e a amplificação do controle positivo interno da planta também foi realizada de forma independente, e o resultado foi bom. Além disso, confirmou-se que o valor fluorescente foi superior, em comparação ao controle positivo interno utilizado no kit de
30 diagnóstico existente da empresa Bioneer Company, e, assim,

a intensidade de reação foi maior.

Além disso, a fim de confirmar que é possível a realização da análise quantitativa, a extração de RNA foi realizada pelo instrumento de separação e purificação de ácido nucleico e a RT-PCR em tempo real foi interpretada no amplificador de ácido nucleico enquanto que as partículas do vírus mosaico do tabaco foram utilizadas nos teores de 102 a 108 de cópia/reação.

Como resultado, as partículas de TMV aplicadas em concentrações de 102 a 108 de cópia/reação são detectáveis pelo menos até 103 de cópia/reação (FIG. 6). Quando um gráfico padrão do modelo padrão de RT-PCR em tempo real foi feito, uma inclinação foi de -0,28 e o valor de R2 foi 1 (FIG. 6). Aqui, R2 representa um coeficiente de correlação mostrando a linearidade do gráfico no gráfico padrão da PCR em tempo real, e isso significa que, como o valor de R2 está mais próximo de 1 (uma vez que o gráfico está mais perto da linha reta), a PCR é mais preferivelmente realizada. Em comparação com o gráfico padrão quando a RT-PCR em tempo real do modelo padrão foi executada em RNA de TMV, a concentração das partículas do vírus mosaico do tabaco possuem uma tendência a serem reduzidas a 1/10 após a extração de RNA. No entanto, o gráfico padrão mostrou um espaço uniforme de acordo com as concentrações do vírus mosaico do tabaco, o que confirmou que a análise quantitativa foi possível.

(3) PCR em Tempo Real utilizando quatro tipos diferentes de ácidos nucleicos (DNA/RNA)

Confirmou-se ser possível, ou não, a detecção e o diagnóstico dos diferentes tipos de ácidos nucleicos alvo

separados e purificados a partir de várias amostras biológicas. Como um amplificador de ácido nucleico que constitui um aparelho para a análise integrada de ácidos nucleicos em tempo real da invenção presente, o Bloco

5 Térmico Quantitativo Exicycler™ (produto da empresa Bioneer, Coreia) foi utilizado e os kits de diagnóstico da empresa Bioneer foram utilizados. Como kits de diagnóstico utilizados na PCR em tempo real, quatro tipos de kits de diagnóstico, ou seja, Kit de PCR Quantitativo de HBV

10 (produto de empresa Bioneer, nº cat HBV-1111), o Kit de RT-PCR quantitativa de HCV (produto de empresa Bioneer, nº. Cat. HCV-1111), Kit de RT-PCR em tempo real da Nova InfA (H1N1) (produto de empresa Bioneer, nº. cat. HCV-1111), e o Kit de RT-PCR em tempo real de CT&NG (produto de empresa

15 Bioneer, nº. cat. STD2A-1111) foram utilizados.

O Kit de PCR quantitativo do HBV é constituído a fim de permitir a análise quantitativa por amplificação do DNA de HBV extraído da amostra de soro, a fim de determinar se a infecção por hepatite b ocorre ou não. Para o Kit de PCR

20 quantitativo do HBV, uma solução de mistura de PCR de 5 µl de tampão de PCR 10x, 5U de wTfi polimerase, 5 µl de 20 mM de dNTP, pirofosfatase termoestável, PPi, e similares, e um iniciador (primer) e uma sonda projetados para especificamente amplificar apenas DNA de HBV são

25 liofilizados (Tabela 2).

O kit de PCR em tempo Real de CT & NG é constituído a fim de amplificar simultaneamente o DNA de Chlamydia Trachomatis (CT) e DNA de Neisseria gonorrhoeae (NG) extraídos das amostras de urina ou cotonetes no tubo de uma

30 reação, a fim de determinar se a infecção venérea ocorre ou

não. O kit de PCR em tempo Real de CT & NG possui a mesma solução de mistura de PCR que o kit de diagnóstico do HBV, e um iniciador (primer) e uma sonda projetados para especificamente amplificar somente o DNA de cT ou NDA de NG
5 são liofilizados (Tabela 2).

Os dois kits de diagnóstico acima têm semelhança na amplificação do DNA, mas têm uma diferença no fato de que o kit de diagnóstico do HBV amplifica um tipo único de DNA viral extraído do soro e o kit de diagnóstico de CT & NG
10 amplifica simultaneamente dois tipos de DNA bacteriano, ou seja, o DNA de CT e o DNA de NG extraídos de urina de uma só vez. Além disso, o kit de diagnóstico do HBV é projetado para a análise quantitativa de DNA e o kit de diagnóstico de CT & NG destina-se à análise qualitativa do DNA.

[Tabela 2]

	Iniciador Direto	Iniciador Reverso	Sonda
HBV	CCAATCACTACCAACCTCTTGT	AACAGGATGAAGAGGAATATGATAAAA	TCCTGGCTATCGCRGGATGTGTCTGC
HCV	GCGGAACCGGTGAGTACAC	TCAGCCAGTACCACAAGGC	CGTGCCCCCGCAAGACTGCT
CT	GGTATTAGTATTGCGCTTIGAGT	GTGATCATAAGGCTTGGTTCAG	CTGCTTCCTCTTGAAGCTCTGCC
NG	CGTAATACCGCATACGCTTGAGA	CGCCAACCAAGCTAATCAGATATC	CTTGGGGCTTGGGCTATCCGA
Nova H1N1	GGCTGGATCCTGGAAATC	TCGATGAAATCTCTGGGTAC	ACTCTCCACAGCAAGCTCATGGTCC

O Kit de RT-PCR quantitativo de HCV, que é desenvolvido para diagnosticar se a infecção por hepatite c ocorre ou não, é semelhante ao kit de diagnóstico do HBV pelo fato de que a análise quantitativa é possível através
20 da amplificação do ácido nucleico extraído do soro, mas diferente do kit de diagnóstico do HBV pelo fato de que o kit de diagnóstico de HBV amplifica o DNA viral e o kit de diagnóstico de hepatite c amplifica o RNA viral através de

RT-PCR.

O Kit de RT-PCR da Nova InfA (H1N1) em tempo real, desenvolvido recentemente para diagnosticar se infecção da nova influenza ocorre ou não, tem uma semelhança pelo fato de o RNA alvo ser amplificado, mas possui uma diferença pelo fato de o RNA ser extraído de um órgão respiratório em vez de soro, em comparação ao kit de diagnóstico de HCV. Além disso, o Kit de RT-PCR da nova InfA (H1N1) em tempo real é projetado para a análise qualitativa, ao contrário do kit de diagnóstico de HCV permitindo a análise quantitativa. Como para o kit de diagnóstico de HCV ou o kit de diagnóstico da nova InfA (H1N1) para a RT-PCR do RNA, uma solução de mistura de RT-PCR, 5 μl de tampão de RT 10x, 600U de MMLV, 5 unidades de wTfi, 3 μl 20 mM de dNTP, 50 mM de DTT, 15U de RNasin, estabilizador e similares, e um iniciador (primer) e uma sonda projetados para amplificar seletivamente o RNA de HCV ou o RNA da nova InfA (H1N1) são liofilizados (Tabela 2). O iniciador (primer) e a sonda incluídos em cada kit de diagnóstico são projetados para apresentar valores de T_m semelhantes que variam de 55°C a 57°C, e, assim, é possível executar as PCRs utilizando quatro tipos diferentes de kits de diagnóstico ao mesmo tempo.

A fim de executar simultaneamente as PCRs ou RT-PCRs utilizando quatro tipos diferentes de kits de diagnóstico no amplificador de ácido nucleico, primeiramente, 5 μl de DNA ou RNA modelo, 1 μl de DNA ou RNA para o controle interno positivo (IPC) e 44 μl de água destilada são colocados na mistura de PCR seca, e misturados para atingir o volume total de 50 μl . O RNA ou DNA do modelo foi

sintetizado utilizando uma parte específica de cada alvo, que é selecionada por meio de um processo de alinhamento, por um método de síntese de gene (NBiochem. Biophys. Res. Commun.1998, 248, 200-203) na empresa Bionner e, em
5 seguida, clonado utilizando um vetor pGEM-T-Easy Vector (da empresa Promega, EUA).

Os kits de diagnóstico de HBV, HCV, CT & NG e nova InfA (H1N1) foram carregados no bloco de circulação de temperatura de um único amplificador de ácidos nucleicos em
10 tempo real, e as colunas e poços são definidos no programa de software correspondentemente à área atribuída. As PCRs foram simultaneamente realizadas sob a condição de PCR de uma reação transcrição reversa a 45 °C durante 15 minutos, seguida por 45 ciclos de 95°C por 5 minutos para
15 desnaturação, 95°C por 5 segundos e 55°C por 5 segundos. Como kit de diagnóstico de HBV e o kit de diagnóstico de HCV, 101 a 107 de cópia/reação de DNAs de modelo foram respectivamente utilizados para a análise quantitativa. Como kit de diagnóstico de CT & NG e kit de diagnóstico de
20 nova InfA (H1N1), apenas um tipo de concentração de DNA ou RNA modelo de controle positivo foi utilizado para a análise qualitativa.

O DNA ou RNA para o controle positivo interno é um gene projetado para ser amplificado independentemente sem
25 apresentar qualquer efeito na amplificação do DNA ou RNA modelo, e utilizado para verificar se não há problemas na PCR, por meio da confirmação de se o DNA ou RNA de controle positivo interno é apropriadamente amplificado ou não, a partir do resultado do controle negativo no qual o modelo
30 de DNA ou RNA nunca é amplificado.

Como resultado, o DNA modelo do kit de diagnóstico de HBV aplicado em concentrações de 10^1 a 10^7 de cópia/reação são detectáveis pelo menos até 10^1 de cópia/reação (FIG. 6), e quando um gráfico padrão do modelo padrão de RT-PCR em tempo real foi feito, uma inclinação foi de -0,28 e o valor de R^2 foi 1 (FIG. 9). Aqui, R^2 representa um coeficiente de correlação mostrando a linearidade do gráfico no gráfico padrão da PCR em tempo real, e isso significa que, como o valor de R^2 está mais próximo de 1 (uma vez que o gráfico está mais perto da linha reta), a PCR é mais preferivelmente realizada. Ademais, no caso do kit de diagnóstico de HCV, o modelo de RNA foi detectável pelo menos até 10^1 de cópia/reação (FIG. 10), e quando um gráfico padrão do modelo padrão de RT-PCR em tempo real foi feito, uma inclinação foi de -0,29 e o valor de R^2 foi 0,9998 (FIG. 11). Os resultados acima confirmaram que as PCRs de RNA e DNA poderiam ser simultaneamente realizadas em um único amplificador de ácidos nucleicos em tempo real, independentemente de uma diferença entre o RNA e o DNA.

Também no caso do kit de diagnóstico de CT & NG projetado para a análise qualitativa, quando as PCRs foram realizadas juntamente com os kits de diagnóstico de HBV e HCV, que são kits de análise quantitativa, ao mesmo tempo, todo o DNA de controle positivo de CT, DNA de controle positivo de NG, e DNA para o controle positivo interno são normalmente amplificados. A fim de confirmar o limite detectável, 10^1 a 10^7 de cópia/reação de DNAs modelo de CT e NG foram submetidos à reação. Os resultados confirmaram que 10^1 de cópia/reação dos DNAs modelo de CT e NG foram todos detectáveis. Quando um gráfico padrão do modelo

padrão de RT-PCR em tempo real foi feito, uma inclinação foi de -0,28 e o valor de R^2 foi 0,9997 em CT e uma inclinação foi de -0,30 e o valor de R^2 foi de 0,9996 em NG.

5 Também no caso onde o kit de diagnóstico da nova InfA (H1N1) foi aplicado no método semelhante ao kit de diagnóstico de CT & NG, confirmou-se que o RNA de controle foi amplificado normalmente. A fim de confirmar o limite detectável, 101 a 107 de cópia/reação de DNAs modelo da
10 nova InfA (H1N1) foram submetidos à reação. Os resultados confirmaram que 101 de cópia/reação dos DNAs modelo da nova InfA (H1N1) foram detectáveis. Quando um gráfico padrão da RT-PCR em tempo real do modelo padrão foi feito, uma inclinação foi de -0,28 e o valor de R^2 foi 0,9996.
15 Portanto, confirmou-se que as PCRs que utilizam até mesmo os kits projetados para a análise quantitativa ou análise qualitativa podem ser executadas simultaneamente.

Os resultados do experimento acima confirmaram que, na realização de PCR e RT-PCR utilizando um único amplificador
20 em tempo real de ácidos nucleicos incluído no aparelho para a análise integrada de ácidos nucleicos em tempo real, o DNA e o RNA extraídos de amostras diferentes, tais como soro, urina, um órgão respiratório e similares podem ser amplificados simultaneamente nas mesmas condições, mesmo
25 quando são utilizados quatro tipos diferentes de kits de diagnóstico projetados para a análise quantitativa ou para a análise qualitativa.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para detecção simultânea de uma pluralidade de ácidos nucleicos alvo executado por um sistema de análise integrada em tempo real de ácidos nucleicos compreendendo uma pluralidade de instrumentos automáticos de purificação e separação, um amplificador em tempo real de ácidos nucleicos, e um controlador, o método compreendendo:

1) a separação de ácidos nucleicos a partir de várias amostras biológicas e purificando os ácidos nucleicos separados, pela pluralidade de instrumentos automáticos de purificação e separação;

2) a aplicação dos ácidos nucleicos purificados a uma pluralidade de tubos de reação, em que a pluralidade de tubos de reação inclui um primeiro tubo de reação para a detecção de um primeiro ácido nucleico alvo e um segundo tubo de reação para a detecção de um segundo ácido nucleico alvo diferente do primeiro ácido nucleico alvo;

3) a atribuição de poços de um bloco de circulação de temperatura de múltiplos poços para a pluralidade de tubos de reação de acordo com o ácido nucleico alvo, em que um primeiro poço é atribuído ao primeiro tubo de reação e um segundo poço é atribuído ao segundo tubo de reação, e armazenando informação nas amostras para cada poço de cada dos grupos de poços;

4) o carregamento de cada uma da pluralidade de tubos de reação preparados na etapa 2) para um poço em concordância com a informação nas amostras biológicas, em que o primeiro tubo de reação é carregado no primeiro poço e o segundo tubo de reação é carregado no segundo poço; e

5) a amplificação simultânea do primeiro ácido nucleico alvo carregado no primeiro poço e o segundo ácido nucleico alvo carregado no segundo poço sob a mesma condição de temperatura e a realização de pelo menos uma análise qualitativa e uma análise quantitativa dos ácidos nucleicos alvo respectivos separados da pluralidade de amostras biológicas, e, assim, obter os resultados de amplificação, em que um primeiro conjunto de iniciador e uma primeira sonda é adicionado ao primeiro tubo de reação para amplificar e detectar o primeiro ácido nucleico alvo, e um segundo conjunto de iniciador e uma segunda sonda é adicionado ao segundo tubo de reação para amplificar e detectar o segundo ácido nucleico alvo, caracterizado pelo fato de que:

- na etapa 1), ácidos nucleicos são também separados a partir de amostras padrão;

- na etapa 3), uma primeira informação em uma amostra padrão e amostra biológica do primeiro tubo de reação e uma segunda informação em uma amostra padrão e amostra biológica do segundo tubo de reação é armazenado; e

em que o primeiro e segundo conjuntos de iniciadores e a primeira e segunda sondas são diferentes um do outro e tem um ponto de fusão semelhante de tal forma que a amplificação simultânea e análise dos ácidos nucleicos são executadas sob as mesmas condições de temperatura, e

em que o primeiro ácido nucleico alvo é separado a partir de uma primeira amostra biológica e o segundo ácido nucleico alvo é separado a partir de uma segunda amostra biológica diferente da primeira amostra biológica.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1,

caracterizado pelo fato de que na etapa 2), o tubo de reação é preparado através da aplicação da solução de ácido nucleico separada e purificada em um tubo de reação, no qual contém os componentes secos necessários para a
5 amplificação de ácidos nucleicos e a solução separada e purificada e os componentes secos são misturados no tubo de reação.

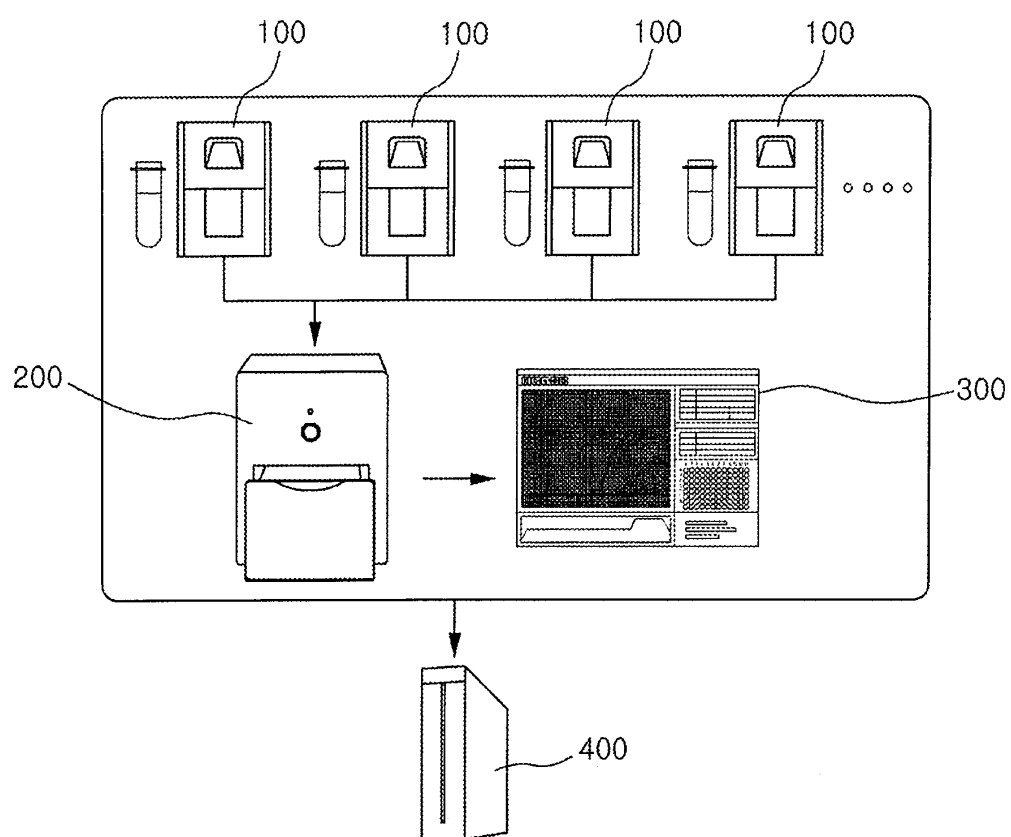


FIG. 1

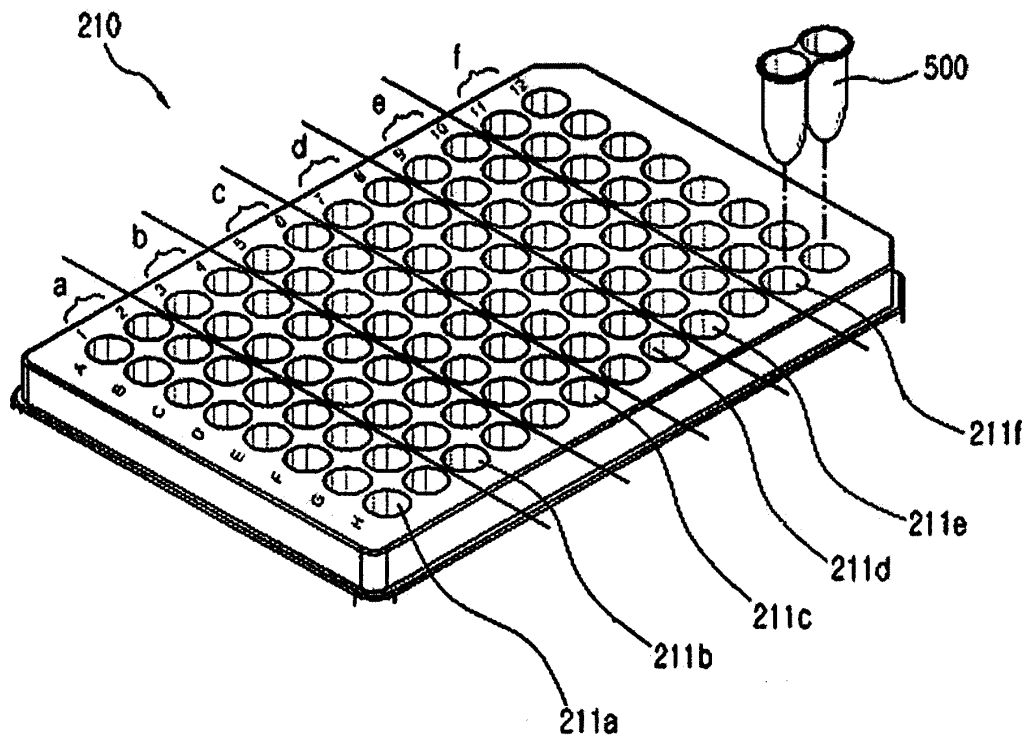
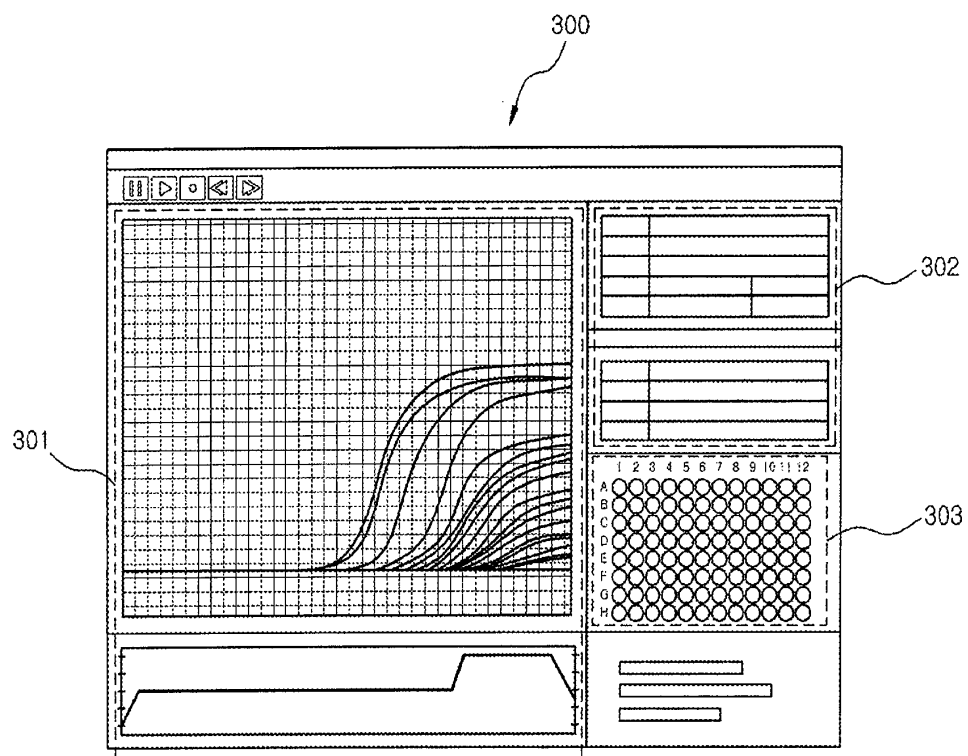


FIG. 2



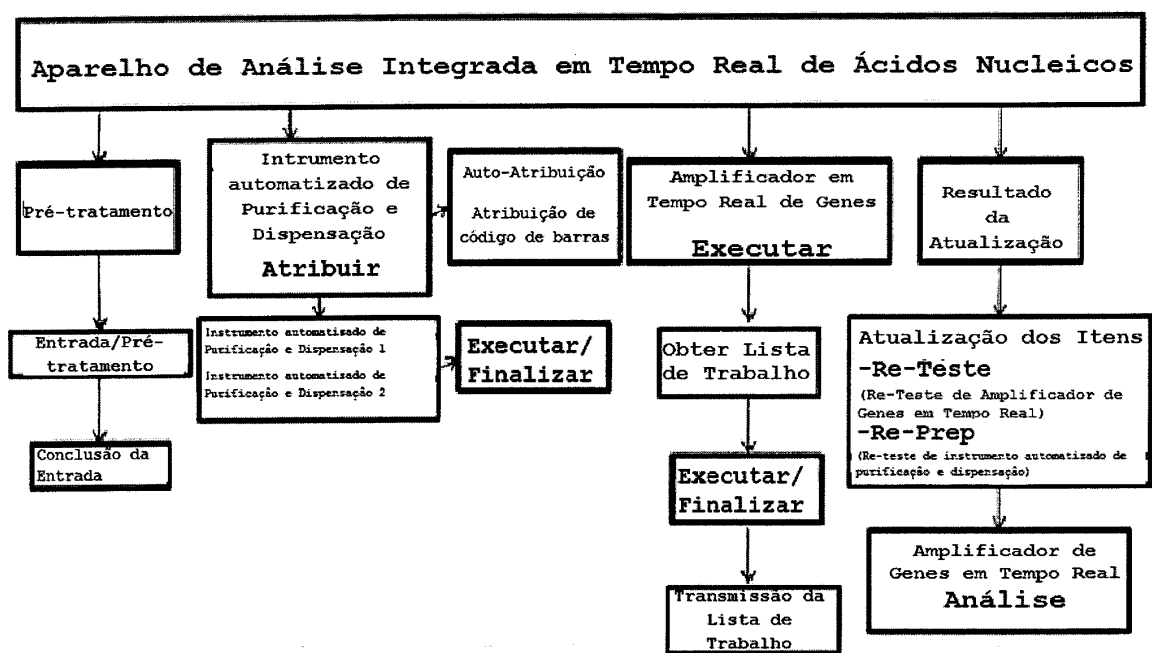


FIG. 4

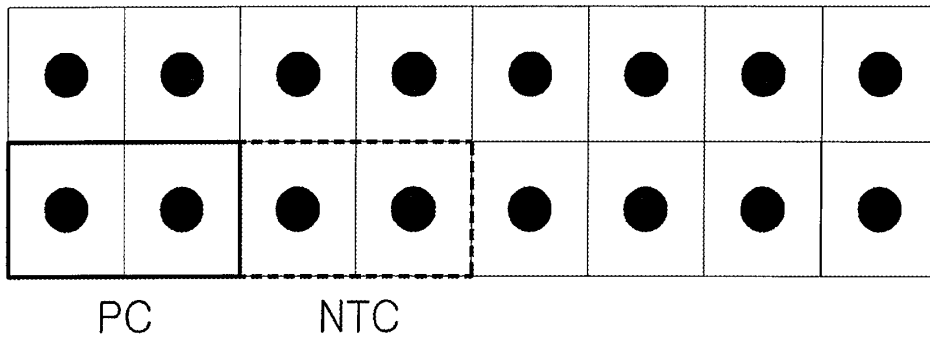


FIG. 5

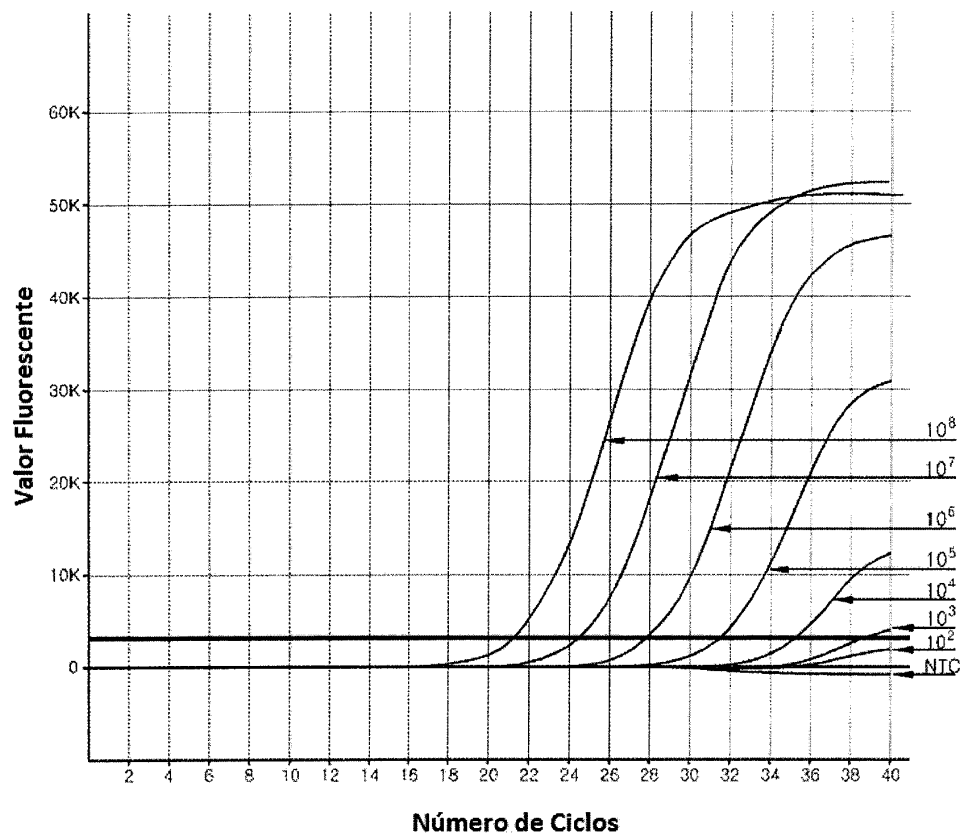


FIG. 6

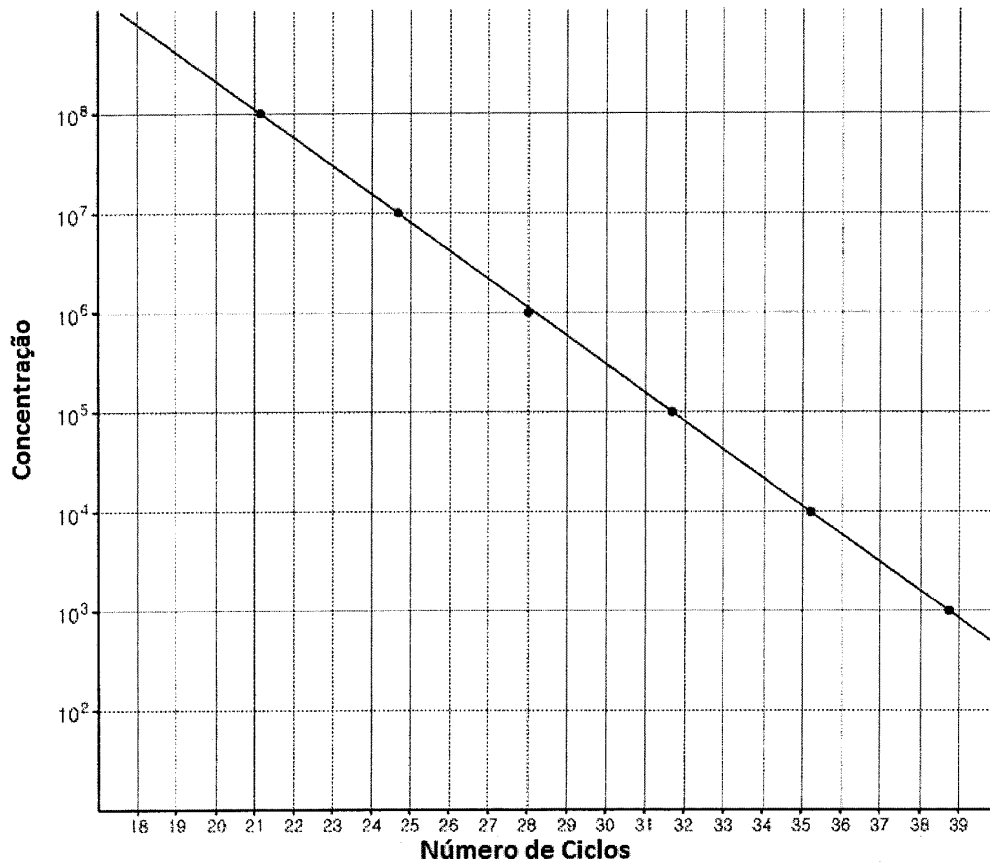


FIG. 7

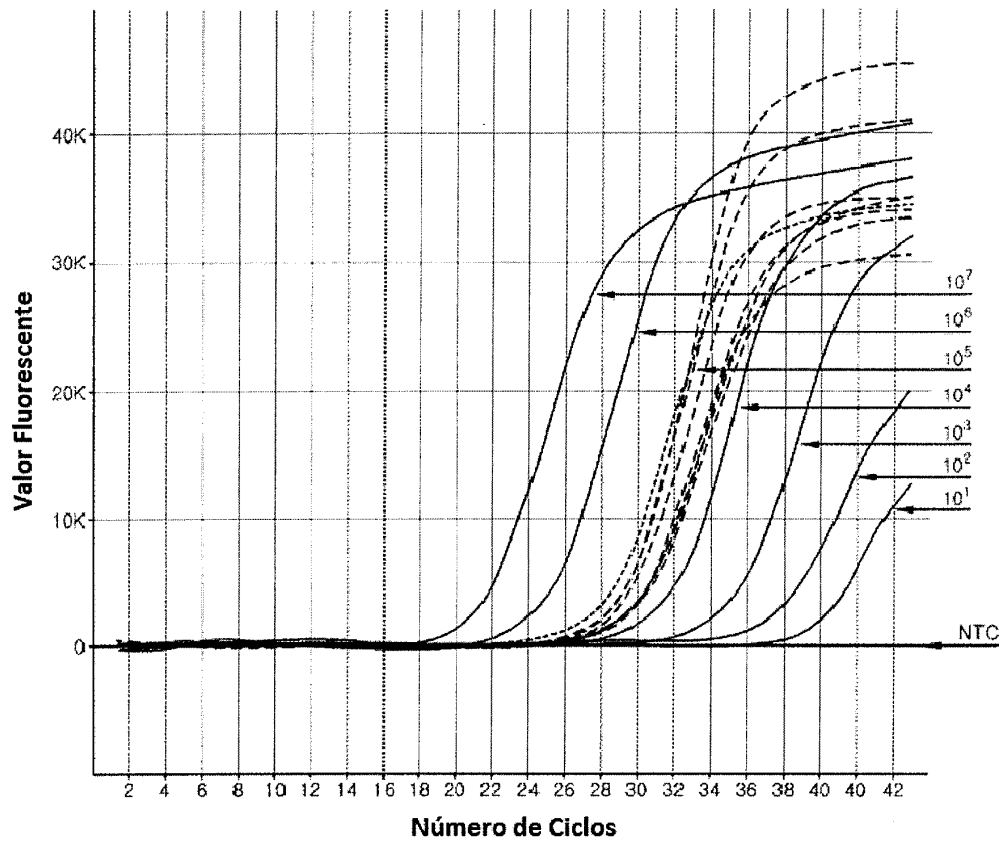


FIG. 8

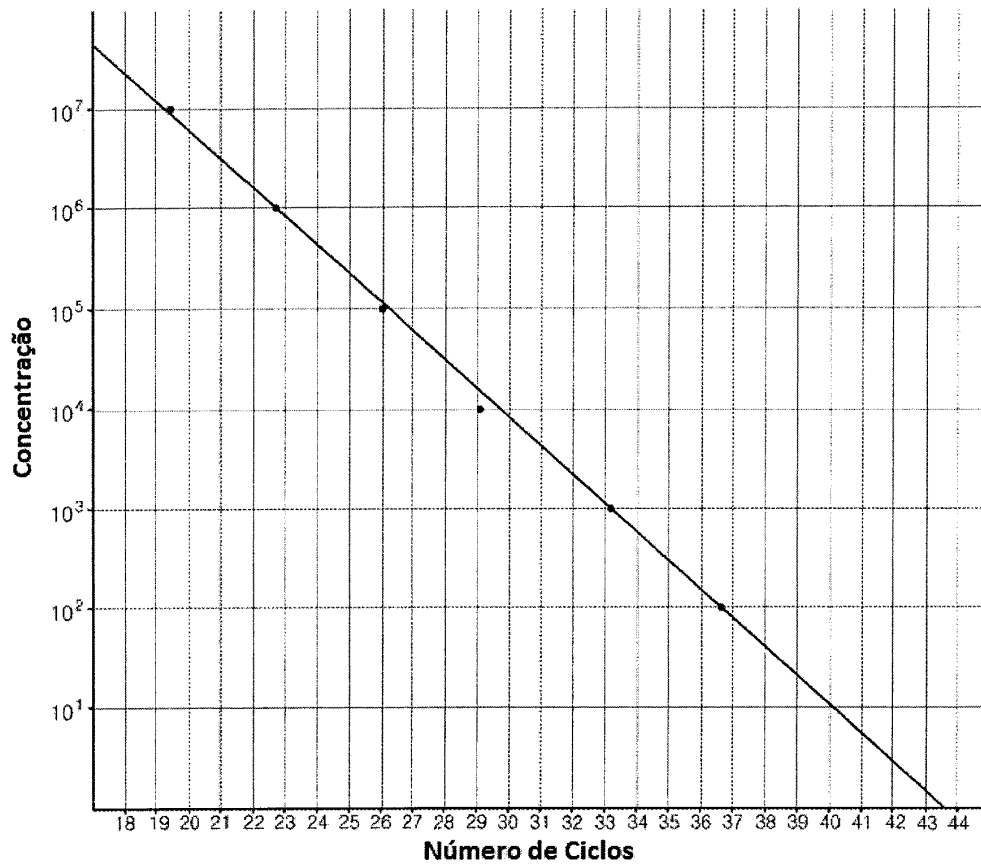


FIG. 9

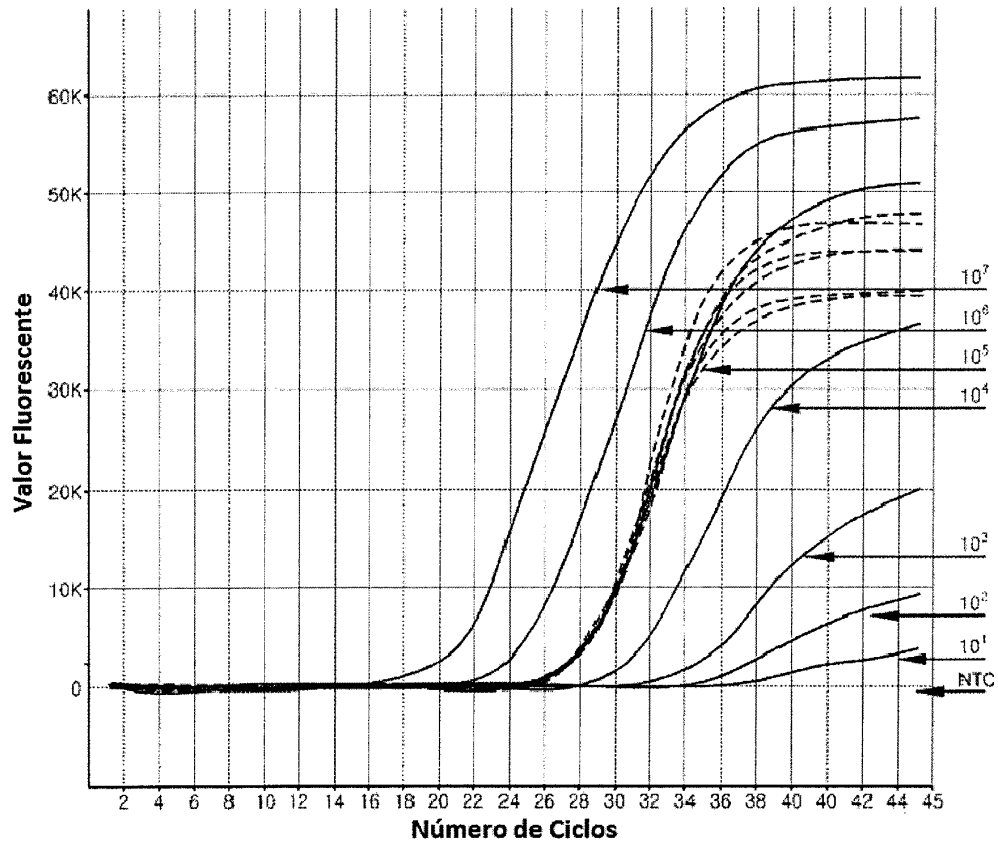


FIG. 10

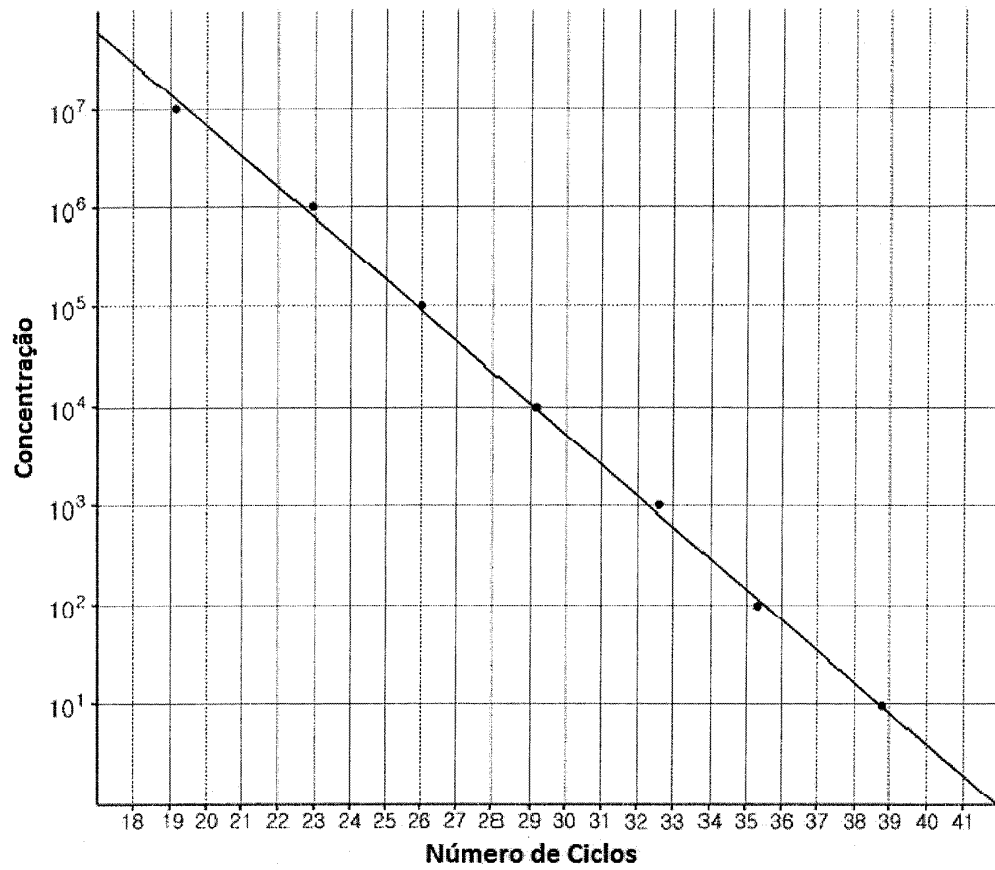


FIG. 11