



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

(21) PI 0816357-0 A2



(22) Data do Depósito: 13/10/2008

(43) Data da Publicação Nacional: 18/08/2020

(54) Título: MICROSHIP

(51) Int. Cl.: G01N 33/48; G01N 33/487.

(30) Prioridade Unionista: 12/10/2007 IN 02313/CHE/2007; 12/10/2007 IN 02312/CHE/2007; 12/10/2007 IN 02314/CHE/2007; 12/10/2007 IN 02311/CHE/2007; 15/10/2007 IN 02328/CHE/2007.

(71) Depositante(es): BIGTEC PRIVATE LIMITED.

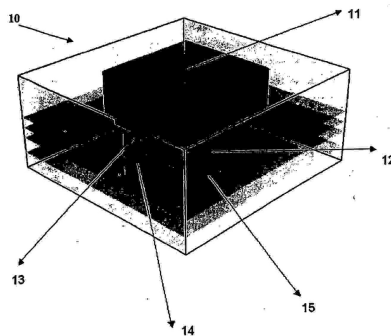
(72) Inventor(es): KUMAR, KISHORE, KRISHNA; JAYARAMAN, RAVIPRAKASH; NARASIMHA, SANKARANAND, KAIPA; RADHAKRISHNAN, RENJITH, MAHILADEVI; VISWANATHAN, SATHYADEEP; NAIR, CHANDRASEKHAR, BHASKARAN; SUBBARAO, PILLARISSETTI, VENKATA; JAGANNATH, MANJULA; CHENNAKRISHNAIAH, SHILPA.

(86) Pedido PCT: PCT IN2008000666 de 13/10/2008

(87) Publicação PCT: WO 2009/047805 de 16/04/2009

(85) Data da Fase Nacional: 12/04/2010

(57) Resumo: MICROCHIP. A invenção é um microchip incluindo uma diversidade de camadas de LTCC em que uma câmara de reação é formada em uma diversidade de camadas superiores para carregar amostras. Um aquecedor embutido em pelo menos uma das camadas abaixo da câmara de reação e um sensor de temperatura embutido em pelo menos uma das camadas entre o aquecedor e a câmara de reação para analisar a amostra. O sensor de temperatura pode ser colocado fora do chip para medir a temperatura do chip.



MICROCHIP

ÁREA DA INVENÇÃO

A exposição se relaciona a um microchip PCR (reação em cadeia da polimerase) incluindo uma diversidade de camadas feita de cerâmica co-sinterizada a baixas
5 temperaturas (LTCC). A exposição também inclui um dispositivo PCR portátil de tempo real com microchip PCR LTCC descartável.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Os recentes avanços em biologia molecular e celular aconteceram, em grande parte, como resultado do desenvolvimento de técnicas analíticas rápidas e eficientes.
10 Graças à miniaturização e multiplexação, técnicas como chip genético ou biochip permitem a caracterização de genomas completos em uma única configuração experimental. PCR é um método de biologia molecular para amplificação in vivo de moléculas de ácido nuclear. A técnica PCR está substituindo rapidamente outras técnicas demoradas e menos sensíveis para identificação de espécies biológicas e
15 patógenos em amostras forenses, ambientais, clínicas e industriais. Entre as biotécnicas, PCR se tornou a etapa analítica mais importante nos laboratórios de ciências biológicas para um grande número de diagnósticos moleculares e clínicos. Desenvolvimentos importantes feitos na tecnologia PCR, como PCR em tempo real, levaram a processos de reação rápida em comparação com métodos convencionais.
20 Durante vários anos, a tecnologia de microfabricação vem se expandindo para a miniaturização do sistema de análise e reação tal como análise PCR com intenção de reduzir ainda mais o tempo de análise e o consumo de reagentes. Vários grupos de pesquisa vêm trabalhando em dispositivos de microlaboratório ("lab-on-a-chip") e levaram a diversos avanços nos campos de sistemas miniaturizados de separação e
25 reação.

Na maioria dos PCRs hoje disponíveis, não são possíveis mudanças instantâneas de temperatura em razão das capacidades de amostra, recipiente e calor do ciclador, e como resultado têm-se maiores tempos de amplificação de 2 a 6 horas. Durante os períodos em que a temperatura da amostra está em transição, ocorrem reações estranhas e indesejáveis que consomem reagentes importantes e criam compostos interferentes indesejados.

OBJETIVOS DA INVENÇÃO

Um objetivo da presente invenção era fornecer um microchip que permitisse desempenho PCR mais veloz.

10 Outro objetivo da presente invenção era fornecer um microchip melhorado.

Um dos principais objetivos da invenção é desenvolver um microchip incluindo uma diversidade de camadas de LTCC.

Ainda outro objetivo da invenção é desenvolver um método para fabricar o microchip.

15 Ainda outro objetivo da invenção é desenvolver um microdispositivo PCR incluindo o microchip.

Ainda outro objetivo da presente invenção é desenvolver um método para diagnosticar situações de doença usando o microdispositivo PCR.

DECLARAÇÃO DA INVENÇÃO

20 Assim, a invenção fornece um microchip incluindo uma diversidade de camadas feitas de cerâmica co-sinterizada a baixa temperatura (LTCC), em que uma câmara de reação é formada em uma diversidade de camadas de câmara de reação para carregar uma amostra, um condutor está embutido em pelo menos uma camada condutora colocada abaixo da câmara de reação e um aquecedor está embutido em
25 pelo menos uma camada de aquecedor colocada abaixo da(s) camada(s)

condutora(s); um método para fabricar um microchip incluindo as etapas:

(a) disposição de uma diversidade de camadas feitas de cerâmica co-sinterizada a baixas temperaturas (LTCC) e possuindo um poço para formar uma câmara de reação,

5 (b) colocação de pelo menos uma camada de LTCC incluindo o aquecedor abaixo da câmara,

(c) colocação de uma ou várias camadas condutoras entre o aquecedor e a câmara de reação, e

(d) interconexão das camadas para formar o microchip;

10 Um microdispositivo PCR incluindo:

(a) um microchip incluindo uma diversidade de camadas de LTCC, em que uma câmara de reação é formada em uma diversidade de camadas para carregar a amostra, o condutor está embutido em pelo menos uma camada colocada abaixo da câmara de reação e o aquecedor está embutido em pelo menos uma camada

15 colocada abaixo da(s) camada(s) condutora(s);

(b) um sensor de temperatura embutido no microchip ou colocado fora do chip para medir a temperatura do chip.

(c) um circuito de controle para controlar o aquecedor com base na entrada do sensor de temperatura, e

20 (d) um sistema óptico para detectar sinal fluorescente da amostra;

Um método de detectar um analito em uma amostra ou diagnosticar uma condição de doença usando um microdispositivo PCR, tal método incluindo os seguintes passos:

(a) carga de uma amostra incluindo ácido nucléico em um microchip incluindo uma

25 diversidade de camadas LTCC,

- (b) amplificação do ácido nucléico rodando o microdispositivo PCR; e
- (c) determinar a presença ou ausência de analito com base numa leitura de fluorescência do ácido nucléico amplificado, ou determinar a presença ou ausência de um patógeno com base em uma leitura de fluorescência do ácido nucléico amplificado para diagnosticar a condição de doença.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS ANEXOS

- A invenção será descrita agora com referência aos desenhos anexos: A figura 1 mostra uma visão ortográfica de uma configuração do microchip PCR LTCC.
- A figura 2 mostra uma visão de corte transversal de uma configuração do microchip PCR LTCC.
- A figura 3 mostra um desenho em camadas de uma configuração do microchip PCR LTCC.
- A figura 4 mostra um diagrama de bloco de uma configuração do circuito que controla o aquecedor e o sensor de temperatura.
- A figura 5 mostra um modelo do desenho fabricado da câmara de reação do chip.
- A figura 6 mostra a fusão do fragmento de DNA de lambda-636 usando o aquecedor/termistor integrado, controlado pela unidade de mão.
- A Figura 7 mostra a amplificação PCR do fragmento de DNA de lambda-311 no chip, (a) Sinal de fluorescência de tempo real vindo do chip; (b) Imagem do gel confirmando o produto da amplificação.
- A figura 8 mostra uma imagem do gel do PCR de sangue e plasma processado para a unidade ribossômica 16S de Salmonella.
- A figura 9 mostra uma imagem de um gel de PCR direto de sangue para a unidade ribossômica 16S de Salmonella.
- A figura 10 mostra uma imagem de um gel de PCR direto de plasma para a unidade

ribossômica 16S de Salmonella.

A figura 11 mostra a amplificação PCR do gene da Salmonella usando microchip,

(a) Sinal de fluorescência de tempo real do chip;

(b) Imagem do gel confirmando o produto da amplificação.

- 5 A figura 12 mostra o tempo que se levou para amplificar o DNA Viral da Hepatite B usando o chip LTCC.

A figura 13 mostra uma curva de fusão do chip LTCC para derivada do sinal de fluorescência para a fusão do DNA λ -311.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

- 10 A presente invenção se relaciona a um microchip incluindo uma diversidade de camadas feitas de cerâmica co-sinterizada a baixa temperatura (LTCC), em que uma câmara de reação é formada em uma diversidade de camadas de câmara de reação para carregar uma amostra, um condutor está embutido em pelo menos uma camada condutora colocada abaixo da câmara de reação e um aquecedor está
- 15 embutido em pelo menos uma camada de aquecedor colocada abaixo da(s) camada(s) condutora(s).

Em uma configuração da presente invenção a câmara de reação é coberta com uma tampa de vedação transparente.

Em uma configuração da presente invenção, o chip inclui um sensor de temperatura.

- 20 Em uma configuração da presente invenção o sensor de temperatura está embutido em pelo menos uma camada do chip.

Em uma configuração da presente invenção, o sensor de temperatura é um termistor.

- Em uma configuração da presente invenção, o chip fornece almofadas de contato
- 25 para conectar o circuito de controle externo ao sensor de temperatura e ao

aquecedor.

Em uma configuração da presente invenção o sensor de temperatura é colocado fora do chip para medir sua temperatura.

Em uma configuração da presente invenção a câmara de reação é cercada por
5 anéis condutores.

Em uma configuração da presente invenção os anéis condutores são conectados à(s) camada(s) condutora(s) por pilares.

Em uma configuração da presente invenção o condutor é feito de um material selecionado de um grupo incluindo ouro, prata, platina e paládio ou ligas destes.

10 Em uma configuração da presente invenção há um intervalo entre a base da câmara de reação e o aquecedor, tal intervalo ficando na faixa entre 0,2 mm até cerca de 0,7 mm.

Em uma configuração da presente invenção, a amostra é alimento ou uma amostra biológica selecionada de um grupo incluindo sangue, soro, plasma, tecidos, saliva,
15 escarro e urina.

Em uma configuração da presente invenção, a câmara de reação possui um volume na faixa de 1 µl até cerca de 25 µl.

A presente invenção também se relaciona a um método de fabricação do microchip, incluindo as etapas:

20 a) disposição de uma diversidade de camadas feitas de cerâmica co-sinterizada a baixas temperaturas (LTCC) e possuindo um poço para formar uma câmara de reação,

b) colocação de pelo menos uma camada de LTCC incluindo o aquecedor abaixo da câmara,

25 c) colocação de uma ou várias camadas condutoras entre o aquecedor e a câmara

de reação, e

d) interconexão das camadas para formar o microchip.

Em uma configuração da presente invenção, colocando pelo menos uma camada de LTCC incluindo um sensor de temperatura entre o aquecedor e a câmara de reação

5 ou abaixo do aquecedor.

Em uma configuração da presente invenção a câmara é cercada por anéis condutores.

Uma configuração da presente invenção fornece pilares para conectar os anéis condutores à(s) camada(s) condutora(s).

10 A presente invenção se relaciona a um microdispositivo PCR de mão incluindo:

a) um microchip incluindo uma diversidade de camadas de LTCC, em que uma câmara de reação é formada em uma diversidade de camadas para carregar a amostra, o condutor está embutido em pelo menos uma camada colocada abaixo da câmara de reação e o aquecedor está embutido em pelo menos uma camada

15 colocada abaixo da(s) camada(s) condutora(s);

b) um sensor de temperatura embutido no microchip ou colocado fora do chip para medir a temperatura do chip.

c) um circuito de controle para controlar o aquecedor com base na entrada do sensor de temperatura, e

20 d) um sistema óptico para detectar sinal fluorescente da amostra.

Em uma configuração da presente invenção, o dispositivo é um dispositivo de mão.

Em uma configuração da presente invenção, o dispositivo é controlado por uma plataforma portátil de computação.

Em uma configuração da presente invenção, o dispositivo é disposto em um arranjo

25 para executar múltiplos PCRs.

Em uma configuração da presente invenção, o microchip pode ser liberado do dispositivo.

A presente invenção também se relaciona a um método de detectar um analito em uma amostra ou diagnosticar uma condição de doença usando um microdispositivo

5 PCR, tal método incluindo os seguintes passos:

a) carga de uma amostra incluindo ácido nucléico em um microchip incluindo uma diversidade de camadas LTC,

b) amplificação do ácido nucléico rodando o microdispositivo PCR; e

c) determinação da presença ou ausência de analito com base numa leitura de
10 fluorescência do ácido nucléico amplificado, ou determinar a presença ou ausência de um patógeno com base em uma leitura de fluorescência do ácido nucléico amplificado para diagnosticar a condição de doença.

Em uma configuração da presente invenção, o ácido nucléico é DNA ou RNA.

Em uma configuração da presente invenção, o método fornece análise tanto
15 qualitativa quanto quantitativa dos produtos amplificados.

Em uma configuração da presente invenção, a amostra é alimento ou amostra biológica.

Em uma configuração da presente invenção, a amostra biológica é selecionada de um grupo incluindo sangue, soro, plasma, tecidos, saliva, escarro e urina.

20 Em uma configuração da presente invenção, o patógeno é selecionado de um grupo incluindo vírus, bactérias, fungos, leveduras e protozoários.

A expressão "camada de câmara de reação" na exposição se refere a qualquer camada do microchip envolvida na formação da câmara de reação e que entra em contato com a amostra.

25 A expressão "camada condutora" na exposição se refere a qualquer camada do

microchip contendo um condutor embutido.

A expressão "camada de aquecedor" na exposição se refere a qualquer camada do microchip contendo um aquecedor embutido.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica descoberta para sintetizar
5 múltiplas cópias de um fragmento específico de DNA de um modelo. O processo
PCR original se baseia na enzima de polimerase de DNA de calor estável de
Thermus aquaticus (Taq), que pode sintetizar uma fita complementar a uma
determinada fita de DNA em uma mistura contendo quatro bases de DNA e dois
fragmentos de DNA iniciador ladeando a sequência alvo. A mistura é aquecida para
10 separar as fitas de DNA de dupla hélice contendo a sequência alvo e depois
resfriada para permitir aos iniciadores que encontrem e se liguem às sequências
complementares nas fitas separadas e que a polimerase Taq estenda os iniciadores
em novas fitas complementares. Ciclos repetidos de aquecimento e resfriamento
multiplicam o DNA alvo exponencialmente, já que cada nova fita dupla se separa
15 para tornar-se dois modelos para síntese subsequente.

Um perfil de temperatura típico para a reação em cadeia da polimerase é como
segue:

1. Desnaturação a 930C por 15 a 30 segundos
2. Recozimento do Iniciador a 550C para 15 a 30 segundos
- 20 3. Extensão dos iniciadores a 720C por 30 a 60 segundos

Como exemplo, na primeira etapa, a solução é aquecida a 90-950C de forma que o
modelo de dupla fita se funde ("desnatura") para formar duas fitas individuais. No
próximo paço, ela é resfriada para 50-55°C de forma que pequenos fragmentos de
DNA especialmente sintetizados ("iniciadores") se unem à seção complementar
25 apropriada do modelo ("recozimento"). Finalmente, a solução é aquecida a 72°C

quando uma enzima específica ("DNA polimerase") estende os iniciadores unindo bases complementares da solução. Assim, duas fitas duplas idênticas são sintetizadas a partir de uma única fita dupla.

A etapa de extensão do iniciador tem que ser aumentada em aproximadamente 5 60seg/kbase para gerar produtos mais longos do que algumas centenas de bases. Os tempos acima são típicos para instrumentação; na verdade, as etapas de desnaturação e recozimento acontecem quase instantaneamente, mas os índices de temperatura em instrumentos comerciais são menores do que 10C/seg quando são usados blocos de metal ou água para equilíbrio térmico e são colocadas amostras 10 nos tubos plásticos de microcentrifugação.

Efetuando-se a microusinagem de câmaras PCR de baixa massa termicamente isoladas, é possível produzir em massa um instrumento PCR mais específico e com uso mais eficiente de energia. Além disso, as rápidas transições de uma temperatura para outra asseguram que a amostra permaneça um tempo mínimo em 15 temperaturas intermediárias indesejadas, de forma que o DNA amplificado venha a ter fidelidade e pureza ideais.

Cerâmica Co-sinterizada a Baixas Temperaturas (LTCC) é a versão moderna da tecnologia de película espessa que é usada na embalagem de componentes eletrônicos para a indústria automotiva, de defesa, aeroespacial e de 20 telecomunicações. É um material vítreo de cerâmica com base em alumina que é quimicamente inerte, biocompatível, termicamente estável condução térmica ($>600^{\circ}\text{C}$), com baixa condução térmica ($<3\text{W/mK}$), boa força mecânica e proporciona boa hermeticidade. É convencionalmente usada na embalagem de dispositivos eletrônicos em nível de chip onde realizam funções estruturais e 25 elétricas. Os presentes inventores reconheceram a adequação da LTCC para ser

usada em aplicações de microchip PCR e, tanto quanto os inventores saibam, a LTCC não foi usada antes para tal objetivo. Os substratos básicos na tecnologia LTCC são, de preferência, camadas não queimadas (verdes) de material vítreo de cerâmica com um aglomerante polimérico. As características estruturais são

5 formadas pelo corte/punção/perfuração dessas camadas e empilhamento de camadas múltiplas. O processo camada por camada possibilita a criação de componentes tridimensionais essenciais para MEMS (Microsistemas Eletromecânicos). Componentes tão pequenos quanto 50 microns podem ser prontamente fabricados em LTCC. Circuitos elétricos são fabricados serigrafando-se

10 uma pasta condutora e resistiva em cada camada. As múltiplas camadas são interconectadas pela punção de vias e preenchimento das mesmas com a pasta condutora. Essas camadas são empilhadas, comprimidas e queimadas. A literatura registra o processamento de pilhas de até 80 camadas. O material queimado é denso e possui boa força mecânica.

15 Tipicamente, o produto PCR é analisado usando eletroforese em gel. Nessa técnica, fragmentos de DNA após PCR são separados em um campo elétrico e observados por tingimento com corante fluorescente. Um esquema mais adequado é usar um corante fluorescente que se ligue especificamente a um DNA de fita dupla para monitorar a reação continuamente (PCR em tempo real). Um exemplo de tal corante

20 é SYBR VERDE que é excitado por luz azul de 490nm e emite luz verde de 520nm quando ligado ao DNA. A intensidade da fluorescência é proporcional à quantidade de DNA produto de dupla fita formado durante PCR e dessa forma aumenta com o número de ciclos.

A figura 1 mostra uma visão ortográfica de uma configuração do microchip PCR

25 indicando a câmara de reação (11) ou poço. A figura indica a montagem do

aquecedor (12) e um termistor sensor de temperatura (13) dentro do microchip PCR LTCC. Também são indicadas as linhas condutoras do aquecedor (15) e as linhas condutoras do termistor (14). Essas linhas condutoras irão ajudar a fornecer conexão ao aquecedor e o termistor embutidos no chip com sistema de circuito

5 externo.

Faz-se referência à Figura 2, que mostra uma visão de corte transversal de uma configuração do microchip PCR LTCC em que (16a & 16b) indicam as almofadas de contato para o aquecedor (12) e (17a & 17b) indicam a almofada de contato para o termistor (13).

10 Faz-se referência à Figura 3, que mostra um projeto por camadas de uma configuração de microchip PCR LTCC em que o chip é composto de 12 camadas de fitas LTCC. Há duas camadas de base (31), três camadas intermediárias contendo a camada de aquecedor (32), uma camada condutora (33) e uma camada contendo o termistor (34), enquanto (35) forma a camada de interface para a câmara de reação

15 (11). As camadas de câmara de reação (36) consistem de seis camadas, como mostrado. Também é fornecida uma camada condutora (33) entre as camadas de aquecedor e termistor. Também são indicadas as linhas condutoras do aquecedor (33) e as linhas condutoras do termistor (32). A figura mostra que as linhas condutoras (32) são colocadas em ambos os lados da camada de termistor (34). O desenho do

20 aquecedor pode ser de qualquer feitiço, como "escada", "serpentina", "linha", "placa", etc., com o tamanho variando de 0,2mm x 3mm a 2mm x 2mm. O tamanho e o feitiço do aquecedor podem ser selecionados com base nos requisitos. Os requisitos podem depender do tamanho da câmara de reação ou da amostra que está sendo testada ou o material sendo usado como camada condutora.

25 A Figura 3 mostra o projeto de camada e uma imagem de uma configuração do chip

embalado fabricado. O chip LTCC possui um volume de poço de 1 a 25 μl e uma variação de resistência (aquecedor e termistor) de cerca de 50%. Os valores de resistência do aquecedor ($\sim 40\ \Omega$) e do termistor ($\sim 1050\ \Omega$) foram coerentes com os valores estimados. O aquecedor se baseia no elemento resistivo de película espessa que é utilizado em pacotes LTCC convencionais. O sistema de termistor com alumina é usado para fabricação de sensores de temperatura embutidos. O TCR medido do chip foi entre 1 e 2 $\Omega/^{\circ}\text{C}$. O chip foi fabricado em sistema verde DuPont 951. A camada de termistor pode ser colocada em qualquer parte no chip ou um sensor de temperatura pode ser colocado fora do chip em vez do termistor dentro do chip.

A figura 4 mostra um diagrama de bloco de uma configuração do circuito que controla o aquecedor e o termistor em que o termistor no microchip PCR LTCC (10) age como um dos braços no circuito em ponte (46). A saída amplificada de ponte vinda do amplificador de ponte (41) é alimentada como entrada no controlador PID (43) onde é digitalizada, e o algoritmo PID fornece uma saída digital controlada. A saída é novamente convertida de voltar para a voltagem analógica e isso conduz o aquecedor usando um transistor de força presente no condutor do aquecedor (46). Além disso, é mais barato processar LTCC em comparação com o de silício.

A invenção também propicia melhorar os sistemas PCR convencionais em tempo de análise, portabilidade, volume de amostra e capacidade de realizar análise e quantificação de rendimento. Isso se obtém com um microdispositivo PCR portátil, com detecção/quantificação em tempo real in loco dos produtos PCR, incluindo o que segue:

- Chip PCR descartável consistindo de câmara(s) de reação, aquecedor embutido e um sensor de temperatura com uma tampa de vedação transparente.

- Uma unidade eletrônica de mão consistindo das seguintes unidades
 - * circuito de controle para o aquecedor e o sensor de temperatura.
 - * sistema de detecção óptica de fluorescência.
 - Um smart phone ou PDA (assistente digital pessoal) rodando um programa para
- 5 controlar a citada unidade de mão.

O chip PCR descartável consiste de uma câmara de reação que é aquecida por um aquecedor embutido e monitorada por um termistor embutido. É fabricado pelo sistema de Cerâmica Co-sinterizada a Baixas Temperaturas (LTCC) e embalado de forma adequada com um conector com contatos para o aquecedor e sensor de

10 temperatura.

O aquecedor embutido é feito de pasta resistiva como a série CF da DuPont, compatível com LTCC. Pode ser usado qualquer sistema de fita de cerâmica verde, como DuPont 95, ESL (série 41XXX), Ferro (sistema A6) ou Haraeus. O citado sensor de temperatura embutido é um termistor fabricado usando uma pasta de

15 resistência de termistor de PTC (Coeficiente de Temperatura Positivo) (por exemplo: 509X D, ESL 2612 de ESL Electroscience) para substrato de alumina. NTC: Coeficiente de Temperatura negativo de pasta de resistência como NTC 4993 da EMCA Remex também pode ser usado.

A tampa de vedação transparente (comprimento de onda de 300 a 1000nm) é para

20 prevenir a evaporação da amostra da citada câmara de reação e é feita de material polímero.

O circuito de controle consistiria de um circuito de controle liga/desliga ou um PID (Diferencial Integral Proporcional) que controlaria o aquecedor com base na saída de um circuito em ponte do qual o termistor faria parte. O método de controlar o

25 aquecedor e ler o valor do termistor mostrado aqui é somente um exemplo. Este não

deve ser considerado o único modo de lidar com o controlador ou uma limitação. Outro meio e método de controlar o aquecedor e ler o valor do termistor é aplicável ao caso ora divulgado.

O sistema de detecção óptica de fluorescência incluiria uma fonte de excitação de um LED (Diodo Emissor de Luz) e a fluorescência detectada por um fotodiodo. O sistema iria alojar fibras ópticas que seriam usadas para projetar a luz na amostra. Também pode ser usada fibra óptica para canalizar a luz no fotodiodo. O LED e o fotodiodo são acoplados à fibra óptica através de um filtro de passagem de banda apropriado. A medição precisa do sinal de saída do fotodetector requer um circuito que possua uma relação sinal/ruído extremamente boa. O sistema de detecção de fluorescência aqui divulgado é somente um exemplo. Este não deve ser considerado o único modo de detecção ou uma limitação. Qualquer detector de fluorescência iria funcionar a menos que não conseguisse se projetar na amostra.

A invenção fornece um sistema PCR de mão comercializável para aplicação específica de diagnóstico. O PDA possui um software de controle rodando para fornecer um sistema PCR de mão completo com detecção em tempo real e software de controle.

Reduzindo-se a massa térmica e os índices melhorados de aquecimento/resfriamento usando o dispositivo, o tempo que se leva de 2 a 3 horas para concluir uma reação de 30 a 40 ciclos, mesmo para um volume moderado de amostra de 5-25 μ l, foi reduzido para menos de 30 minutos. A figura 12 mostra o tempo que se levou para amplificar o DNA Viral da Hepatite B usando o chip LTCC da invenção. O PCR foi rodado por 45 ciclos e conseguiu obter amplificação em 45 minutos. Além disso, a amplificação também foi observada quando o PCR foi rodado por 45 ciclos em 20 minutos e 15 minutos. A duração convencional de HBV (45

ciclos) seria de cerca de 2 horas.

A miniaturização permite leituras precisas com menores tamanhos de amostra e consumo de menores volumes dos caros reagentes. As pequenas massas térmicas dos Microsistemas e os pequenos tamanhos de amostra permitem uma ciclagem
5 térmica de baixa energia, aumentando a velocidade de muitos processos, tal como replicação de DNA através de micro PCR. Além disso, os processos químicos que dependem da química de superfície são bastante melhorados pelas relações superfície/volume aumentadas que são disponíveis na microescala. As vantagens dos microfluídicos levaram à demanda pelo desenvolvimento de microsistemas
10 integrados para análise química.

O microchip traduzido em um dispositivo de mão dessa forma remove a máquina PCR de um sofisticado laboratório, assim aumentando o alcance dessa técnica bastante poderosa, seja para diagnóstico clínico, teste de alimento, testes de sangue em bancos de sangue ou várias outras áreas de aplicação.

15 Os instrumentos PCR existentes, com múltiplas câmaras de reação, fornecem múltiplos locais de experimento de DNA todos rodando o mesmo protocolo térmico, de forma que não são eficientes em relação ao tempo. Surge a necessidade de reduzir o tempo de reação e volume de tomada de amostra.

O PCR instantâneo, se projetado no futuro, poderia ter uma gama de dispositivos
20 com resposta térmica bastante rápida e alto isolamento dos chips PCR adjacentes para rodar múltiplas reações de forma eficaz e independente com diferentes protocolos térmicos e mínima diafonia.

A análise ou quantificação dos produtos PCR é realizada pela integração prática de um sistema de detecção de fluorescência em tempo real. Este sistema também
25 poderia ser integrado a sistemas de quantificação e sensores para detectar doenças

como Hepatite B (Figura 12), AIDS, tuberculose, etc. Outros mercados incluem monitoramento de alimentos, análise de DNA, ciência forense e monitoramento ambiental.

Após determinar a uniformidade do perfil de temperatura dentro do chip, foram realizadas reações PCR nesses chips. Fragmentos de DNA de Lambda e DNA de Salmonella foram amplificados com sucesso usando esses chips. A Figura 5 mostra o microchip em 3 visões dimensionais, mostrando suas diversas conexões com o aquecedor, anéis condutores, termistor e anéis condutores (52). Também mostra pilares (51) que estão conectando os anéis condutores (52) à placa condutora (33).

A figura 6 mostra um desenho comparativo da fusão do fragmento de DNA λ -636 no chip usando o aquecedor e termistor integrados.

A figura 7 mostra o aumento no sinal de fluorescência associado à amplificação do DNA λ -311. O perfil térmico foi controlado pela unidade de mão e a reação foi realizada em um chip (mistura da reação de 3 μ l e óleo de 6 μ l). A fluorescência foi

monitorada usando um amplificador lock-in convencional.

A invenção também fornece um sistema diagnóstico. O procedimento adotado para desenvolver o sistema diagnóstico foi o de inicialmente padronizar os protocolos térmicos para alguns problemas e funcionalizá-los no chip. Os iniciadores designados para o DNA ribossômico 16S amplificaram o fragmento de E. coli e Salmonella em ~ 300 - 400 bp enquanto os iniciadores para o gene stn amplificaram o fragmento de Salmonella typhi em ~ 200 bp.

Os produtos obtidos foram confirmados por detecção de fluorescência verde SYBR bem como eletroforese em gel de agarose. As figuras 7 e 11 mostram a figura gel do DNA λ -311 amplificado e o gene de Salmonella usando microchip.

Perfil térmico para amplificação de DNA λ -311:

Desnaturação: 94°C (90s)

94°C (30s) - 50°C (30s) - 72°C (45s)

Extensão: 72°C (120s)

Perfil térmico para amplificação do gene da Salmonella:

5 Desnaturação: 94°C (90s)

94°C (30s) - 55°C (30s) - 72°C (30s)

Extensão: 72°C (300s)

PCR com sangue e plasma processado

O sangue ou plasma foi tratado com um agente de precipitação que pode precipitar
10 as principais substâncias inibidoras de PCR dessas amostras. O sobrenadante claro
foi usado como modelo. Usando este protocolo, foram obtidas amplificações para
fragmentos de ~200 bp de Salmonella typhi (figura 8). Na figura 8, a imagem de
eletroforese em gel mostra

1. reação de controle,
- 15 2. Produto PCR - sangue sem processamento,
3. Produto PCR - sangue com processamento
4. Produto PCR - plasma processado

Tampão para PCR direto de sangue

Um tampão exclusivo foi formulado para PCR direto com amostras de sangue ou
20 plasma. Usando este sistema de tampão exclusivo, foi obtida amplificação de PCR
direto com sangue e plasma. Com este sistema de tampão, foi obtida amplificação
de até 50% para sangue e 40% para plasma (ver Figuras 9 e 10) usando o chip
LTCC da invenção. Na figura 9, a imagem de eletroforese em gel mostra

1. Produto de PCR - 20% de sangue,
- 25 2. Produto de PCR - 30% de sangue,

- 3. Produto de PCR - 40% de sangue,
- 4. Produto de PCR - 50% de sangue, e

Na figura 10, a imagem de eletroforese em gel mostra

- 1. Produto PCR - 20% de plasma,
- 2. Produto PCR - 30% de plasma,
- 3. Produto PCR - 40% de plasma,
- 4. Produto PCR - 50% de plasma,
- 5. reação de controle

- O tampão exclusivo inclui sal de tampão, um cloreto ou sulfato contendo íon bivalente, um detergente não-iônico, um estabilizador e um álcool de açúcar.

A figura 13 mostra uma curva de fusão do chip LTCC para derivada do sinal de fluorescência para a fusão do DNA λ -311. A figura também fornece uma comparação entre esta invenção (131) e o dispositivo PCR convencional (132). Pico maior: valor do pico/largura (eixo x) @ meio valor de pico = 1,2/43

- 15 Pico menor: valor do pico/largura (eixo x) @ meio valor de pico = 0,7/63

Uma relação maior indica um pico maior. Também no gráfico, o eixo y é a derivada (inclinação da curva de fusão), inclinação maior indica maior fusão.

REIVINDICAÇÕES

1. **MICROCHIP**, feito de camadas de cerâmica co-sinterizada a baixas temperaturas (LTCC), **caracterizado** por incluir:
 - a) uma câmara de reação formada em uma diversidade de camadas para carregar
 - 5 uma amostra,
 - b) anéis condutores cercando a câmara de reação, e
 - c) aquecedor embutido em pelo menos uma camada para fornecer calor aos anéis condutores.
2. **MICROCHIP**, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo
10 aquecedor fornecer calor aos anéis condutores através do condutor embutido em pelo menos uma camada, de preferência colocado abaixo da câmara de reação.
3. **MICROCHIP**, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** pelos anéis condutores estarem conectados à(s) camada(s) condutora(s).
4. **MICROCHIP**, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo chip
15 incluir um sensor de temperatura colocado fora do chip ou embutido em pelo menos uma camada do chip.
5. **MICROCHIP**, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo chip fornecer almofadas de contato para conectar o circuito de controle externo ao sensor de temperatura e ao aquecedor.
- 20 6. **MICROCHIP**, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pela base da câmara de reação e do aquecedor possuir um intervalo na faixa entre 0,2 mm até cerca de 0,7 mm.
7. **MICROCHIP**, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pela câmara de reação ter um volume que fica na faixa entre 1 µl até cerca de 25 µl.
- 25 8. **MÉTODO DE FABRICAÇÃO DO MICROCHIP**, **caracterizado** por incluir as

etapas:

- a) disposição de uma diversidade de camadas feitas de LTCC e contendo um poço para formar uma câmara de reação em que a câmara é cercada por anéis condutores.
- 5 b) colocação de pelo menos uma camada de LTCC incluindo o aquecedor abaixo da câmara,
- c) colocação de uma ou várias camadas condutoras entre o aquecedor e a câmara de reação, e
- d) interconexão das camadas para formar o microchip;
- 10 9. **MICRODISPOSITIVO PCR, caracterizado** por incluir:
 - a) um microchip feito de camadas LTCC incluindo> câmara de reação formada em uma diversidade de camadas para carga de uma amostra, anéis condutores cercando a câmara de reação e aquecedor embutido em pelo menos uma camada para fornecer calor aos anéis condutores,
 - 15 b) um sensor de temperatura embutido no microchip ou colocado fora do chip para medir a temperatura do chip.
 - c) um circuito de controle para controlar o aquecedor com base na entrada do sensor de temperatura, e
 - d) um sistema óptico para detectar sinal fluorescente da amostra;
- 20 10. **MICRODISPOSITIVO PCR, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado** pelo dispositivo ser um dispositivo de mão controlado por uma plataforma portátil de computação.
11. **MICRODISPOSITIVO PCR, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado** pelo dispositivo ser disposto de forma a conter múltiplos PCRs.
- 25 12. **MICRODISPOSITIVO PCR, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado**

pelo microchip poder ser liberado do dispositivo.

13. **MÉTODO DE DETECTAR UM ANALITO EM UMA AMOSTRA OU DIAGNOSTICAR UMA CONDIÇÃO DE DOENÇA USANDO UM MICRODISPOSITIVO PCR**, tal método **caracterizado** por incluir os seguintes

5 passos:

a) carga de uma amostra incluindo ácido nucléico em um microchip incluindo uma câmara de reação² cercada por anéis condutores, amplificando o ácido nucléico utilizando o microdispositivo PCR; e

b) determinação da presença ou ausência de analito com base numa leitura de
10 fluorescência do ácido nucléico amplificado, ou determinar a presença ou ausência de um patógeno com base em uma leitura de fluorescência do ácido nucléico amplificado para diagnosticar a condição de doença.

14. **MÉTODO DE DETECTAR UM ANALITO EM UMA AMOSTRA OU DIAGNOSTICAR UMA CONDIÇÃO DE DOENÇA USANDO UM**

15 **MICRODISPOSITIVO PCR**, de acordo com a reivindicação 13, **caracterizado** pelo ácido nucléico ser DNA ou RNA.

15. **MÉTODO DE DETECTAR UM ANALITO EM UMA AMOSTRA OU DIAGNOSTICAR UMA CONDIÇÃO DE DOENÇA USANDO UM MICRODISPOSITIVO PCR**, de acordo com a reivindicação 13, **caracterizado** pelo

20 método fornecer análise qualitativa e quantitativa dos produtos amplificados.

1/9

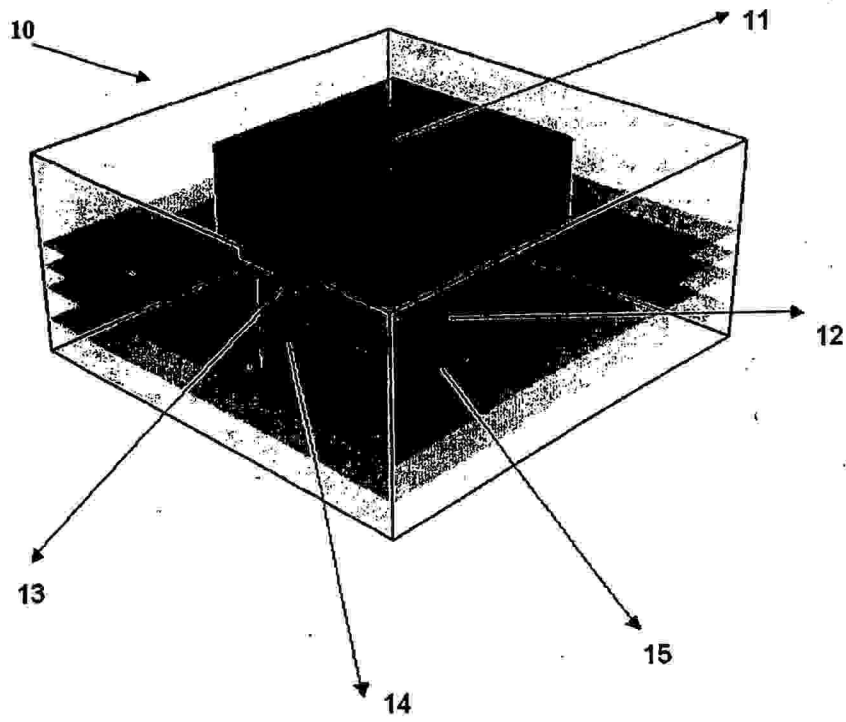


Figura 1

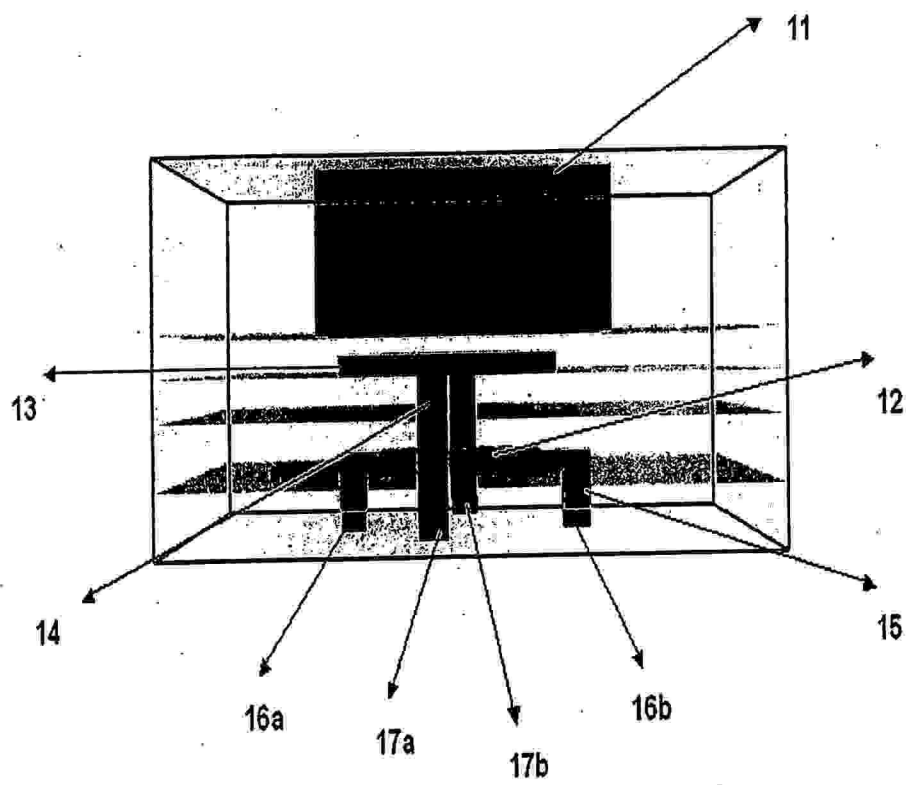


Figura 2

3/9

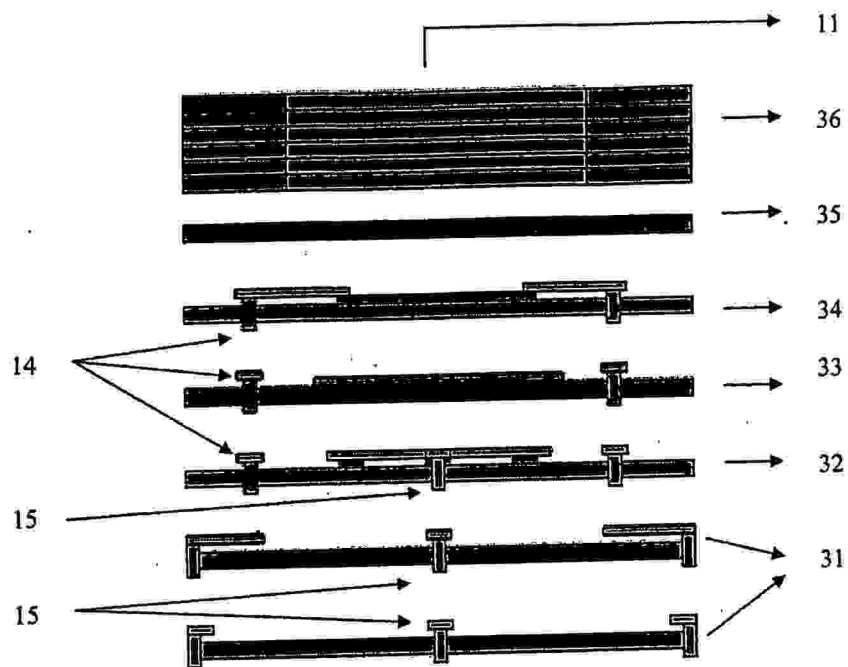


Figura 3

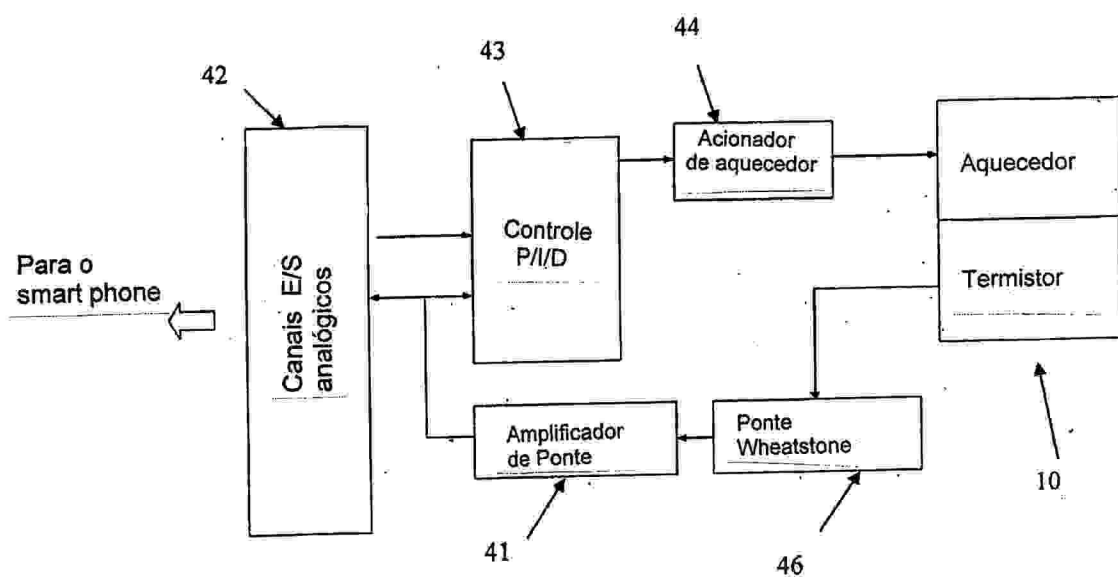


Figura 4

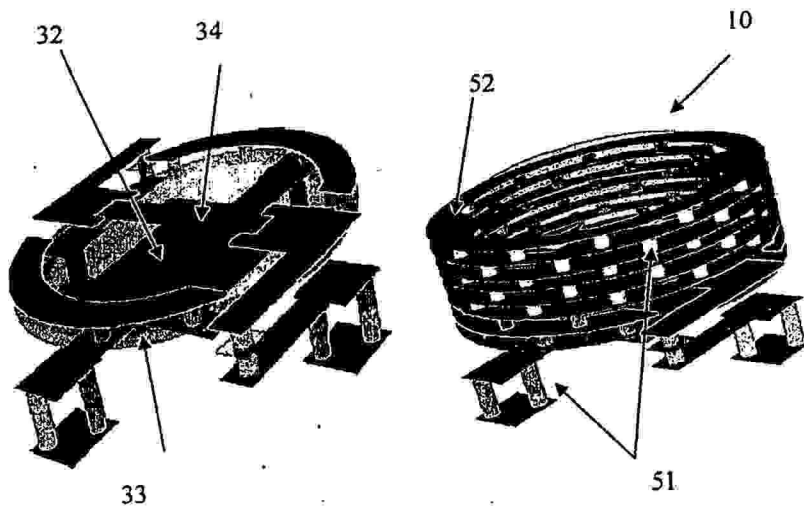


Figura 5

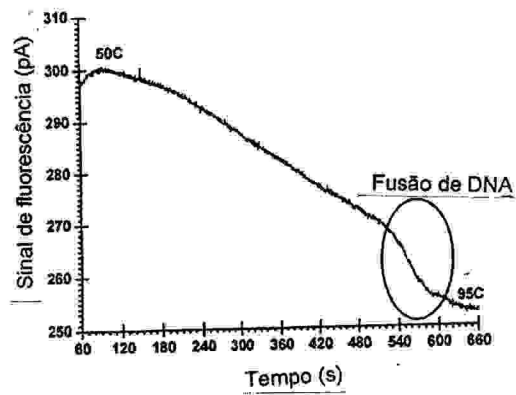
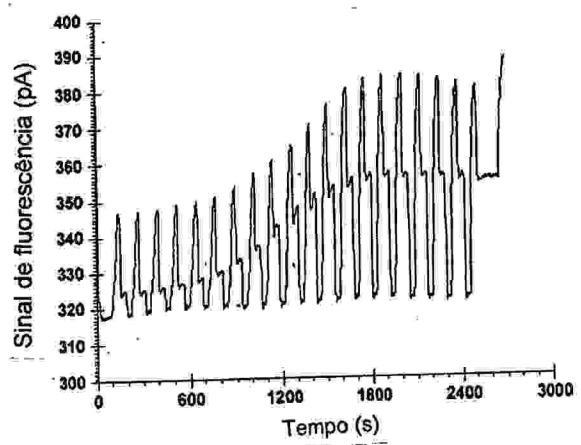
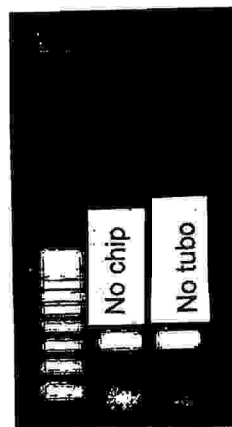


Figura 6



(a)



(b)

Figura 7

7/9

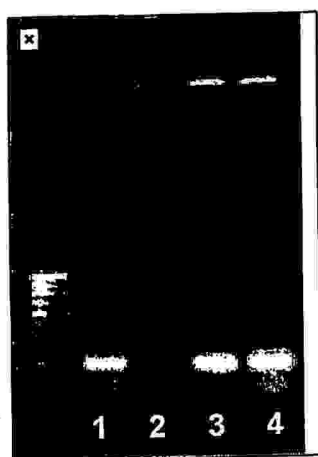


Figura 8

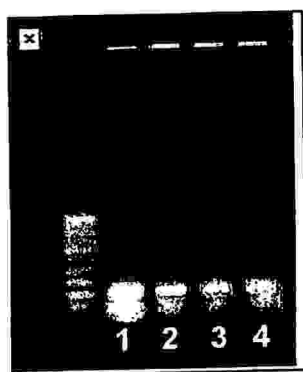


Figura 9

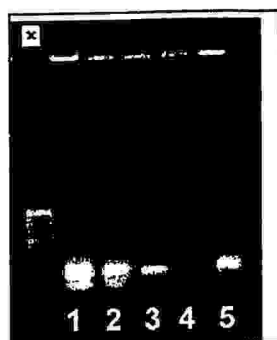


Figura 10

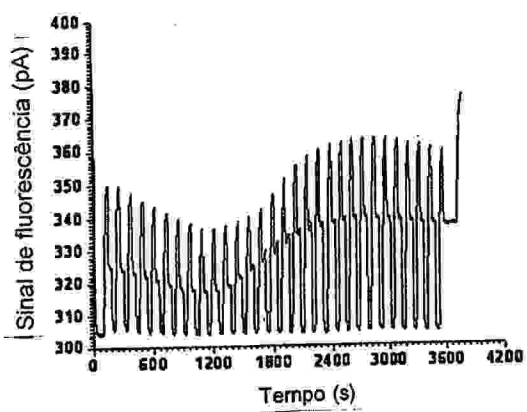
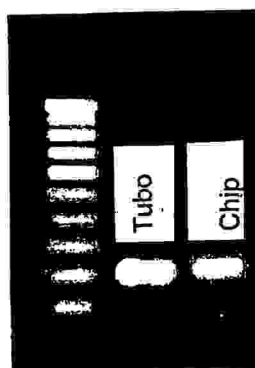


Figura 11



9/9



Figura 12

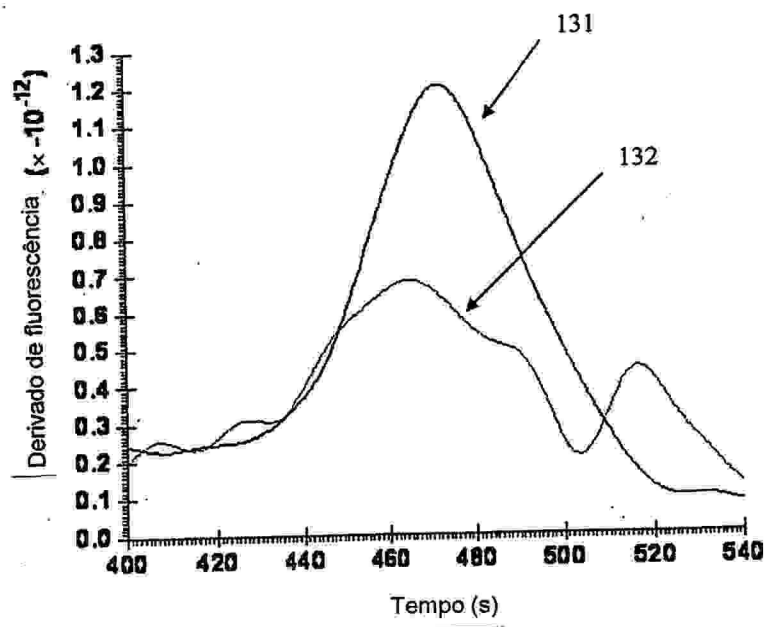


Figura 13

RESUMO

MICROCHIP. A invenção é um microchip incluindo uma diversidade de camadas de LTCC em que uma câmara de reação é formada em uma diversidade de camadas superiores para carregar amostras. Um aquecedor embutido em pelo menos uma das camadas abaixo da câmara de reação e um sensor de temperatura embutido em pelo menos uma das camadas entre o aquecedor e a câmara de reação para analisar a amostra. O sensor de temperatura pode ser colocado fora do chip para medir a temperatura do chip.