

República Federativa do Brasil  
Ministério do Desenvolvimento, Indústria  
e do Comércio Exterior  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI 0712655-7 A2**

(22) Data de Depósito: 24/05/2007  
(43) Data da Publicação: 21/11/2012  
(RPI 2185)



(51) *Int.Cl.:*  
C12Q 1/68  
B01L 3/00

(54) **Título:** DISPOSITIVO DE SENSOR MICROELETRÔNICO, MÉTODO PARA INVESTIGAÇÃO DE PELO MENOS UMA SUBSTÂNCIA ALVO BIOLÓGICA, E, USO DO DISPOSITIVO DE SENSOR MICROELETRÔNICO

(30) **Prioridade Unionista:** 08/06/2006 EP 06115176.7

(73) **Titular(es):** Koninklijke Philips Electronics N.V.

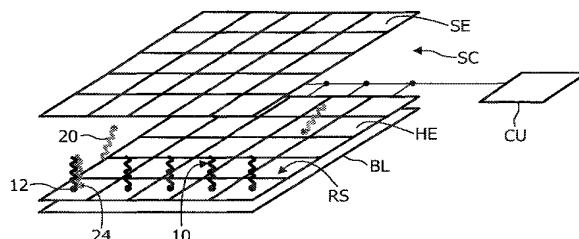
(72) **Inventor(es):** Erik Robbert Vossenaar, Hendrik Roelof Stapert, Marc Wilhelmus Gijsbert Ponjee, Mark Thomas Johnson

(74) **Procurador(es):** Momsen, Leonardos & CIA.

(86) **Pedido Internacional:** PCT IB2007051960 de 24/05/2007

(87) **Publicação Internacional:** WO 2007/141700de  
13/12/2007

(57) **Resumo:** DISPOSITIVO DE SENSOR MICROELETRÔNICO, MÉTODO PARA INVESTIGAÇÃO DE PELO MENOS UMA SUBSTÂNCIA ALVO BIOLÓGICA, E, USO DO DISPOSITIVO DE SENSOR MICROELETRÔNICO. A invenção relaciona-se a um dispositivo de sensor microeletrônico e a um método para investigação de substâncias alvo biológicas (20), por exemplo, oligonucleotídeos como fragmentos de DNA. Em uma realização, o dispositivo compreende uma superfície de reação (RS) à qual reagentes alvo específicos (10) são anexados e que fica entre uma câmara de amostra (SC) e uma arranjo de elementos de aquecimento (HE) seletivamente controláveis. O perfil de temperatura na câmara de amostra (SC) pode ser controlado conforme desejado, para prover, por exemplo, condições para uma PCR e/ou para uma fusão controlada das hibridizações. O reagente (10) e/ou a substância alvo (20) compreendem um rótulo (12) com uma propriedade observável, como fluorescência que muda se a substância alvo (20) é ligada ao reagente (10), citada propriedade sendo detectada por um arranjo de elementos de sensor, por exemplo, foto sensores (SE). A fluorescência do rótulo (12) pode ser preferivelmente transferida por FRET a um rótulo fluorescente (22) diferente ou extinta se a substância alvo (20) é ligada.



“DISPOSITIVO DE SENSOR MICROELETRÔNICO, MÉTODO PARA INVESTIGAÇÃO DE PELO MENOS UMA SUBSTÂNCIA ALVO BIOLÓGICA, E, USO DO DISPOSITIVO DE SENSOR MICROELETRÔNICO”

5                   A invenção relaciona-se a um dispositivo de sensor microeletrônico para a investigação de pelo menos uma substância biológica alvo, particularmente uma molécula de ácido nucleico ou fragmento desta, compreendendo o uso de reagentes alvo específicos e um componente sensor. A invenção compreende adicionalmente um método para investigação de pelo  
10 menos uma substância biológica alvo e um uso do dispositivo de sensor microeletrônico.

US 2005/0009070 A1 descreve um biossensor miniaturizado compreendendo uma placa de multi-poços, onde a temperatura nos poços de reação da citada placa pode ser seletivamente controlada para prover  
15 condições ótimas para uma Reação em cadeia da polimerase (PCR). Na US 6 864 140 B2, é descrito um micro-sensor com elementos de aquecimento locais na forma de um transistor de filme fino formado sobre silício policristalino em um substrato adjacente a uma câmara de amostra onde reações (bio-)químicas ocorrem. Uma investigação adicional da amostra na  
20 câmara de amostra entretanto, não é possível com este dispositivo conhecido. Ainda mais, a US 6 867 048 B2 descreve um biossensor microeletrônico no qual um microchip com um arranjo de elementos sensores é disposto sobre uma membrana com elementos de aquecimento. A membrana permite controlar a temperatura em uma câmara de amostra adjacente do mesmo  
25 modo para todos os elementos de sensor. O WO 02/02794 A descreve um dispositivo de microarranjo integrado compreendendo um substrato com microlocações. Nas ditas microlocações, chips de microarranjos compreendendo porções alvo são colocados. Assim, interações das porções de

segue-se a página 1a

teste com ditas porções alvo podem ser detectadas na introdução de uma amostra compreendendo porções de teste em dita microlocação. A US 2004/151269 A1 descreve um dispositivo para processamento de amostra (por exemplo, amplificação) incluindo uma porção de substrato compreendendo pelo menos uma câmara. Uma pluralidade de camadas de filme fino podem estar presentes adjacentes à câmara de modo a controlar por exemplo, a temperatura da câmara diferencialmente ou para sensorear ou modificar uma propriedade de uma amostra de teste na câmara.

Com base nesta situação, foi um objetivo da presente invenção prover meio para uma investigação mais precisa e efetiva em custo de substâncias biológicas alvo, particularmente em conexão com processos PCR.

Este objetivo é alcançado por um dispositivo de sensor

microeletrônico de acordo com a reivindicação 1, um método de acordo com a reivindicação 18 e um uso de acordo com a reivindicação 29. Realizações preferidas são descritas nas reivindicações dependentes.

Um dispositivo de sensor microeletrônico de acordo com a presente invenção é destinado à investigação de pelo menos uma substância biológica alvo, por exemplo, fragmentos de DNA. O termo “investigação” compreenderá aqui a detecção qualitativa e/ou quantitativa de certas propriedades da substância alvo e opcionalmente também um processamento da citada substância, por exemplo, por PCR. O dispositivo sensor compreende os seguintes componentes:

a) Uma câmara de amostra, na qual a amostra a ser investigada pode ser provida. A câmara de amostra é tipicamente uma cavidade vazia ou cavidade preenchida com alguma substância como um gel que pode absorver uma substância de amostra; esta pode ser uma cavidade aberta, uma cavidade fechada ou uma cavidade conectada a outras cavidades por canais de conexão de fluido. A câmara de amostra contém adicionalmente pelo menos um reagente alvo específico, citado reagente e/ou a substância alvo compreendendo um rótulo que muda uma propriedade observável se o reagente reage com a substância alvo (a mudança pode ocorrer durante e/ou após a reação e pode compreender o aparecimento ou desaparecimento da propriedade). O reagente pode, por exemplo, compreender uma molécula de sonda que se ligada especificamente a certas moléculas alvo biológicas, e o rótulo pode ser uma porção funcional do reagente com alguma propriedade prontamente detectável, por exemplo, fluorescência. A câmara de amostra pode inicialmente conter o reagente em forma sólida (seca), que é então dissolvida na adição de uma amostra.

b) Um componente de sensor para detectar a propriedade observada do rótulo mencionada. O componente de sensor pode compreender uma única unidade de sensor, opcionalmente provida de uma unidade de

exploração para explorar diferentes localizações na câmara de amostra sequencialmente. Alternativamente, o componente de sensor pode compreender diversas unidades de sensor simples que são associadas a diferentes localizações na câmara de amostra.

5                   c) Um componente de aquecimento para trocar calor com pelo menos uma sub região da câmara de amostra, ao ser acionado, por exemplo, com energia elétrica. O componente de aquecimento pode preferivelmente converter energia elétrica em calor, que é transportado na câmara de amostra. Entretanto, é também possível que o componente de aquecimento absorva  
10                   calor da câmara de amostra e o transfira para mais algum lugar sob consumo de energia.

                  d) Uma unidade de controle para acionar seletivamente o componente de aquecimento (isto é, para suprir energia a ele).

                  O dispositivo de sensor microeletrônico descrito permite  
15                   monitorar o progresso de uma reação entre os reagentes alvo específicos na câmara de amostra e uma substância biológica alvo contida em uma amostra, sentindo a propriedade observável do rótulo. Sentir a citada propriedade antes que a reação comece, permite adicionalmente determinar a quantidade de reagentes ou substância alvo na câmara de amostra. Ainda mais, o  
20                   componente de aquecimento pode ser usado para prover condições ótimas para a manipulação, por exemplo, de uma amostra biológica sensível, ou para testar a seletividade do processo de ligação.

                  De acordo com uma realização preferida do dispositivo de sensor microeletrônico, o componente de aquecimento compreende um  
25                   arranjo de aquecimento com diversos elementos de aquecimento individualmente controláveis. No sentido mais geral, o termo “arranjo” denotará no contexto da presente invenção um arranjo arbitrário de uma, duas ou três dimensões de diversos elementos (por exemplo, os elementos de aquecimento). Tipicamente, tal arranjo é bidimensional e preferivelmente

também planar, e os elementos (aquecimento) são arranjados em uma configuração regular, por exemplo, uma configuração de grade ou matriz. Um arranjo de aquecimento com elementos de aquecimento controlados seletivamente pode ser usado para gerar praticamente qualquer perfil de temperatura espacial e/ou temporal desejado na câmara de amostra.

Em uma outra realização preferida, a câmara de amostra compreende uma superfície de reação formando pelo menos uma parte de suas paredes, onde a citada superfície de reação é coberta com o pelo menos um reagente específico. Ligar um reagente específico alvo a uma superfície, tem a vantagem de que é imobilizado em uma localização definida e em uma concentração definida para acesso ótimo pelo componente sensor. Ainda mais, a disponibilidade da informação espacial permite que diferentes sondas de captura possam estar presentes no mesmo compartimento de reação. Reagentes alvo específicos adicionais, não imobilizados podem ou não estar presentes opcionalmente na câmara de amostra residual. Uma vantagem dos reagentes não imobilizados é a cinética mais rápida e hibridizações melhor definidas (nenhuma influência da anexação de superfície).

De acordo ainda com uma outra realização preferida do dispositivo de sensor microeletrônico, a unidade de controle é adaptada para acionar o componente de aquecimento de tal modo que um processo de amplificação pode ocorrer na câmara de amostra. A amplificação pode, por exemplo, ser um processo PCR, que é uma ferramenta importante para a amplificação e investigação de seqüências de nucleotídeo e que requer controle de temperatura e ciclos de aquecimento repetidos. Isto pode ser vantajosamente provido pelo componente de aquecimento do dispositivo de sensor microeletrônico. A PCR preferivelmente ocorre na solução para assegurar cinética de reação eficiente e interações de hibridização bem definidas de iniciadores e/ou sondas de detecção com a substância a ser detectada. Alternativamente, iniciadores anexados à superfície, iniciadores de

ampifluor anexados à superfície, iniciadores LuX anexados à superfície ou Scorpions anexados à superfície podem ser usados. A vantagem da última abordagem é que reações múltiplas podem estar presentes no mesmo compartimento de reação, porque informação espacial está disponível. Em

5 teoria, isto poderia conduzir a sensibilidades mais altas, porque cada compartimento de reações é maior e pode portanto, conter mais volume de amostra.

A unidade de controle pode adicionalmente ser adaptada para acionar o componente de aquecimento de acordo com a curva de fusão de

10 uma hibridização entre o(s) reagente(s) e a(s) substância(s) alvo associada(s). A curva de fusão descreve a quebra da hibridização entre substância alvo e reagente, na dependência da temperatura. Aumentando a temperatura lentamente ao longo da curva de fusão, as hibridizações entre substância alvo fracamente ligada e reagente são dissolvidas primeiro, deixando finalmente

15 apenas as ligações mais fortes e coincidências perfeitas entre substância alvo e reagente. As temperaturas de fusão destes duplex são preferivelmente projetadas para ocorrer a uma temperatura ou faixa de temperaturas bem definida, indicativa da estrutura de seqüência do reagente. Então, um teste de rigor/especificidade da hibridização pode ser realizado.

20 Enquanto o dispositivo de sensor microeletrônico pode compreender em princípio apenas uma espécie de reagente específico alvo, investigações “multiplexadas” mais versáteis se tornam possíveis, se diferentes espécies de reagentes específicos alvo são usados. Em uma realização particular, estes reagentes específicos alvo podem ser distribuídos

25 em uma superfície de reação que é uma parte da câmara de amostra. Ainda mais, citada distribuição pode ser preferivelmente em alinhamento com um arranjo de aquecimento de elementos de aquecimento, como foi definido acima. Então, cada região da superfície de reação que está associada a um elemento de aquecimento particular (isto é, a temperatura na citada região é

predominantemente controlada pelo citado elemento de aquecimento) pode ser revestida de um tipo de reagente associado. Em geral, o termo “alinhamento” denotará uma relação fixa (invariante na translação) entre as posições das duas entidades, isto é, os elementos de aquecimento do arranjo de aquecimento e as regiões diferentemente revestidas na superfície de reação, neste caso.

A câmara de amostra (e, se aplicável, a superfície de reação) pode compreender adicionalmente compartimentos de reação que são, por definição, fisicamente separados um do outro, por exemplo, por paredes intermediárias. Deste modo, é possível executar, com uma amostra provida à câmara de amostra, simulação, diversos processos diferentes em diferentes compartimentos de reação.

Os compartimentos de reação anteriormente mencionados estão preferivelmente em alinhamento com um arranjo de aquecimento de elementos de aquecimento, como foi definido acima. O controle de temperatura provido pelos elementos de aquecimento é então univocamente associado aos compartimentos. Cada compartimento de reação pode ser particularmente associado a apenas um ou possivelmente a poucos elementos de aquecimento diferentes. Ainda mais, as paredes dos compartimentos podem ser opcionalmente projetadas para prover isolamento de calor entre os compartimentos.

O componente sensor do dispositivo de sensor microeletrônico pode compreender particularmente um arranjo de elementos sensores, por exemplo, foto-sensores para detectar fluorescência da luz emitida pelo rótulo. Com diversos elementos de sensor, é possível monitorar em paralelo diferentes regiões na superfície de reação e então diversos processos que estão ocorrendo simultaneamente.

Os elementos de sensor anteriormente mencionados estão preferivelmente em alinhamento com um arranjo de aquecimento de



elementos de aquecimento, como foi definido acima. Os elementos de aquecimento e sensor podem, por exemplo, ser arranjados em pares, ou cada elemento de aquecimento pode ser associado a um grupo de vários elementos de sensor (ou vice-versa). O alinhamento tem a vantagem de que os elementos de aquecimento e sensor interagem similarmente em diferentes localizações. Então, condições uniformes/periódicas são providas através dos arranjos. Esta tecnologia permite realizar também etapas de química (múltiplas).

O componente de aquecimento (ou elementos de aquecimento, se presentes) podem compreender particularmente uma tira resistiva, um transistor de filme fino (TFT), um eletrodo transparente, um elemento de Peltier, um eletrodo de aquecimento de radiofrequência ou um elemento de aquecimento radiativo (IR). Todos estes elementos podem converter energia elétrica em calor, onde o elemento de Peltier pode adicionalmente absorver calor e então prover uma função de resfriamento.

O dispositivo de sensor microeletrônico pode compreender opcionalmente uma unidade de resfriamento, por exemplo, um elemento de Peltier ou uma massa resfriada, em contato térmico com o componente de aquecimento e/ou com a câmara de amostra. Isto permite abaixar a temperatura da câmara de amostra, se necessário. Em combinação com um componente de aquecimento para a geração de calor, uma unidade de resfriamento portanto, habilita o completo controle de temperatura em ambas direções.

O dispositivo de sensor microeletrônico pode compreender adicionalmente pelo menos um sensor de temperatura que torna possível monitorar a temperatura na câmara de amostra. O(s) sensor(es) de temperatura pode(m) preferivelmente ser integrado(s) no componente de aquecimento. Em uma realização particular, o componente de aquecimento compreende pelo menos um elemento de aquecimento que é projetado de tal modo que pode ser operado como um sensor de temperatura, que permite

medir temperatura sem hardware adicional.

Nos casos em que um sensor de temperatura está disponível, a unidade de controle é preferivelmente acoplada ao citado sensor de temperatura e adaptada para controlar o componente de aquecimento em uma malha fechada, de acordo com um perfil de temperatura predeterminado (temporal e/ou espacial) na câmara de amostra. Isto permite prover condições robustamente ótimas para a manipulação, por exemplo, de uma amostra biológica sensível.

O dispositivo de sensor microeletrônico pode compreender adicionalmente um dispositivo micromecânico ou elétrico, por exemplo, uma bomba ou uma válvula, para controlar o fluxo de um fluido e/ou o movimento de partículas na câmara de amostra. Controlar o fluxo de uma amostra ou de partículas é muito importante para uma manipulação versátil de amostras em um dispositivo microfluídico. Em uma realização particular, pelo menos um dos elementos de aquecimento pode ser adaptado para criar fluxo em um fluido na câmara de amostra, por um efeito de termo-capilaridade. Então, sua capacidade de aquecimento pode ser explorada para mover a amostra.

Uma camada de isolamento elétrico e/ou uma camada biocompatível podem ser dispostas entre a câmara de amostra e o arranjo de aquecimento e/ou sensor. Tal camada pode consistir, por exemplo, de dióxido de silício  $\text{SiO}_2$  ou do foto-resistor SU8.

Ao realizar um dispositivo de sensor microeletrônico de acordo com a presente invenção, uma abordagem de matriz de eletrônica de área grande (LAE), preferivelmente uma abordagem de matriz ativa, pode ser usada no sentido de contactar o componente de aquecimento (ou os elementos de aquecimento, se presentes) e/ou o componente sensor (ou componentes sensores, se presentes). A técnica de LAE e especificamente a tecnologia de matriz ativa, usando por exemplo, transistores de filme fino (TFT) é aplicada por exemplo, na produção de visores de painel plano tais como LCDs, OLEDs

e visores eletroforéticos. Uma abordagem de endereçamento de uma linha de cada vez pode ser opcionalmente usada para endereçar elementos de aquecimento pela unidade de controle.

5 A superfície de reação pode ser a superfície de um microchip que compreende o componente de aquecimento e/ou o componente sensor. Em uma realização preferida, a superfície de reação compreende uma membrana porosa que provê uma grande área para a anexação de reagentes.

10 O arranjo mútuo da câmara de amostra, o arranjo de aquecimento e o componente sensor podem ser arbitrários, enquanto a cooperação desejada entre estes componentes é alcançada. Se a câmara de amostra compreende uma superfície de reação revestida com reagentes, esta superfície de reação preferivelmente fica adjacente ao componente de aquecimento. Então, a troca de calor entre o componente de aquecimento e o interior da câmara de amostra ocorre através da superfície de reação,  
15 provendo um controle de temperatura ótimo na citada superfície, onde as reações decisivas ocorrem.

A invenção relaciona-se adicionalmente a um método para investigação de pelo menos uma substância biológica alvo, cujo método compreende as seguintes etapas:

20 a) Prover uma câmara de amostra com pelo menos um reagente alvo específico, onde o reagente alvo específico e/ou a substância alvo compreende um rótulo que muda uma propriedade observável se o reagente reage com a substância alvo.

25 b) Controlar a presença de um reagente alvo específico na câmara de amostra, onde o termo “controle” significa compreender um processo de monitoração simples e opcionalmente também uma mudança ativa da quantidade de reagente na câmara de amostra, com base nos resultados de monitoração. Em qualquer caso, “controlar” incluirá uma determinação ou medição do reagente alvo específico na câmara de amostra,

por exemplo, uma medição impedimétrica de ligação de reagente a uma superfície de reação. Opcionalmente, a própria medição para influenciar uma reação química entre reagente e uma superfície (por exemplo, para imobilizar o reagente), por exemplo, aumentando a temperatura na superfície.

5                   c) Reagir uma substância alvo com os reagentes alvo específicos, onde tais reações compreendem tipicamente uma ligação ou hibridização entre reagente e substância alvo.

                  d) Medir a propriedade observável modificada do rótulo, durante e/ou após a etapa c), isto é, a reação entre substância alvo e reagente.

10               O método em sua forma geral compreende as etapas que podem ser executadas com um dispositivo de sensor microeletrônico da espécie descrita acima. Portanto, é feita referência à descrição precedente para mais informação sobre os detalhes, vantagens e melhoramentos daquele método.

15               Em uma realização preferida do método, o reagente alvo específico compreende o rótulo, e a presença do reagente alvo específico na câmara de amostra é controlada medindo a propriedade observável do citado rótulo.

                  O reagente alvo específico pode opcionalmente ser anexado a  
20               uma superfície de reação na câmara de amostra, que provê informação espacial e então permite diversas medições paralelas.

                  O método pode incluir particularmente um controle de temperatura preciso (preferivelmente de malha fechada) na câmara de amostra (ou, se aplicável, na superfície de reação) de acordo com perfis de  
25               temperatura espacial e/ou temporal desejada. Isto permite o processamento de amostras biológicas sensíveis, rigor de seletividade de processos de ligação de superfície (hibridização), e um controle sobre reações químicas sensíveis à temperatura.

                  De acordo com uma outra realização preferida do método, um

processo PCR é executado na câmara de amostra, particularmente em uma superfície de reação desta.

Ainda mais, a temperatura na superfície de reação mencionada acima pode ser opcionalmente aumentada após a etapa c) de acordo com a curva de fusão de uma hibridização entre substância alvo e reagente.

A seguir, realizações preferidas da invenção serão descritas para aplicar ambos dispositivo de sensor microeletrônico e o método definido acima.

Em uma primeira realização particular do dispositivo de sensor microeletrônico e/ou do método, a propriedade observável do rótulo compreende luminescência (óptica e elétrica, tal como fluorescência, fosforescência, eletroluminescência), magnetização, absorção, colorimetria e/ou refletância. Para fluorescência ser observada, luz de excitação precisa ser provida, por exemplo, por uma luz traseira no dispositivo de sensor microeletrônico. Tal luz de excitação pode também ser usada para observar fosforescência.

Em uma realização praticamente importante do dispositivo de sensor microeletrônico ou do método, a propriedade observável do rótulo está presente (isto é, detectável) se o reagente alvo específico ainda não tiver reagido com a substância alvo. Isto permite, por exemplo, verificar a distribuição adequada do reagente rotulado em uma superfície de reação, após a fabricação de um dispositivo de sensor microeletrônico.

Em uma outra realização do dispositivo de sensor e/ou do método, fluorescência do(s) rótulo(s) é extinta se o reagente alvo específico tiver reagido com a substância alvo. A observação da citada fluorescência antes da reação ocorrer permite, por exemplo, verificar a quantidade de reagente em uma superfície de reação. Durante a reação progressiva entre reagente e substância alvo específica, a fluorescência então diminuirá devido à extinção da fluorescência. Isto provê uma medida indireta da quantidade de

substância alvo específica reagida. A extinção da fluorescência pode ser particularmente alcançada se o reagente compreende o rótulo e a substância alvo compreende um resfriador como um grupo funcional.

Em uma outra realização importante da invenção, fluorescência do(s) rótulo(s) é mudada pela transferência de energia de ressonância de fluorescência (FRET) a partir de um rótulo excitado de um parceiro de reação (por exemplo, o reagente alvo específico) para um rótulo fluorescente de outro parceiro de reação (por exemplo, a substância alvo) se o reagente alvo específico tiver reagido com a substância alvo. Então, fluorescência do rótulo do reagente, que ocorre em um primeiro comprimento de onda, é mudada para fluorescência do rótulo da substância alvo, que ocorre em um segundo comprimento de onda (diferente), ou vice-versa. Isto permite determinar ambas quantidade de reagente ainda não reagido e substância alvo reagida (ou vice-versa). A observação direta da substância alvo reagida permite, por exemplo, distinguir entre substância alvo realmente ligada em que se está interessado nos e pelos processos que diminuem a fluorescência dos rótulos do reagente.

A substância biológica alvo e/ou o reagente alvo específico podem particularmente compreender proteínas e/ou oligonucleotídeos, por exemplo, DNA, RNA, PNA (ácido nucleico peptídeo), LNA (ácido nucleico travado), ANA (ácido arabinonucleico) e/ou HNA (ácido nucleico hexitol). Oligonucleotídeos são de alta importância em uma grande variedade de investigações biológicas. Estes podem por exemplo, ser preparados em um processo PCR, que pode ser vantajosamente executado com um dispositivo de sensor microeletrônico, de acordo com a invenção, devido à possibilidade de um controle de temperatura versátil.

Em uma outra realização da invenção, o reagente compreende um iniciador para um processo PCR. Se o iniciador é imobilizado, isto é, ligado a uma superfície de reação, uma “PCR em estado sólido” é possível.

Na realização anteriormente mencionada, o reagente pode ser particularmente um iniciador Scorpion que compreende ambos um iniciador PCR e uma sonda de hibridização. Esta realização será descrita em mais detalhe com referência às figuras.

5 A invenção relaciona-se adicionalmente ao uso do dispositivo de sensor microeletrônico descrito acima para diagnóstico molecular, análise de amostra biológica, análise de amostra química, análise de alimento, análise ambiental e/ou análise forense.

10 Estes e outros aspectos da invenção serão aparentes e elucidados com referência à(s) realização(ões) posteriormente descritas. Estas realizações serão descritas a título de exemplo, com a ajuda dos desenhos que as acompanham, nos quais:

15 Figura 1 mostra esquematicamente uma vista em perspectiva de um dispositivo de sensor microeletrônico com um arranjo de aquecimento e reagentes fluorescentes de acordo com a presente invenção;

Figura 2 mostra a subdivisão de uma superfície de reação em diferentes compartimentos;

Figura 3 é um diagrama ilustrando uma medição baseada em FRET;

20 Figura 4 é um diagrama ilustrando uma medição baseada no uso de um iniciador Scorpion unimolecular como reagente.

Números de referência iguais nas figuras referem-se a componentes idênticos ou similares.

25 A Reação em cadeia da polimerase (PCR) é um técnica comum usada para amplificação de elementos de genes específicos a partir de uma mistura complexa de fragmentos de DNA. Pode, por exemplo, ser usada para traçar o perfil de expressão de gene, análise genética, tal como traçar o perfil SNP, análise forense, ou detecção e identificação de agentes infecciosos. Para tais finalidades, a análise simultânea de um grande número

de padrões de DNA pode ser necessária. Efetuar e analisar PCRs múltiplas é entretanto, uma tarefa laboriosa e dispendiosa.

É portanto, desejado desenvolver um sistema confiável que permita desempenho simultâneo e/ou análise de PCRs múltiplas. Por exemplo, a identificação de agentes infecciosos (por exemplo, micróbios em fluidos corpóreos ou produtos alimentícios) com PCR, uma seqüência específica da espécie precisa ser analisada. Uma abordagem para fazer isto é amplificar um fragmento de DNA com iniciadores específicos para cada espécie que pode estar potencialmente presente. Isto, entretanto, é uma abordagem muito trabalhosa (e cara), porque cada PCR tem que ser executada separadamente (o número de PCRs que pode ser executada no mesmo tubo de reação é limitado). Uma outra abordagem é fazer uma assim chamada PCR de banda larga. Certos genes são altamente conservados entre espécies (por exemplo, genes rRNA bacterianos). Quando tais genes são escolhidos como alvos PCR, iniciadores que são idênticos para um grande número de espécies podem ser usados para amplificação por PCR. Para a identificação dos micróbios, hibridização pós PCR com sondas específicas de espécie pode ser efetuada. Isto implica em que, para cada espécie, uma sonda específica seja imobilizada em uma superfície sólida em forma de um micro arranjo. Quando uma combinação de recursos de produtos PCR de banda larga é permitida hibridizar com o arranjo, somente os produtos PCR que são complementares à sonda se ligaram.

A seguir, diferentes realizações são descritas, as quais habilitam o desempenho simultâneo e/ou análise de PCRs múltiplas, usando uma superfície de reação na forma de um micro arranjo em um dispositivo de sensor microeletrônico.

Figura 1 mostra esquematicamente um projeto típico de um dispositivo de sensor microeletrônico de acordo com a presente invenção. O dispositivo compreende uma câmara de amostra SC na qual um fluido de



amostra compreendendo moléculas alvo 20 (biológicas) pode ser provido. A parede do fundo da câmara de amostra SC é formada por uma superfície de reação RS na qual reagentes alvo específicos 10 (isto é, sondas de hibridização neste exemplo) são imobilizados. A superfície de reação RS pode ser opcionalmente em um material poroso, que vantajosamente possui uma grande área à qual produtos PCRs podem se ligar. Isto melhora a velocidade de análise, pois a chance de hibridização de produtos PCRs até a superfície é melhorada, bem como a faixa dinâmica do procedimento, uma vez que mais moléculas de sonda podem ser imobilizadas.

A superfície de reação RS é arranjada no topo de um arranjo de aquecimento consistindo de um arranjo retangular de elementos de aquecimento HE que são acoplados a uma unidade de controle CU para controle individual. Então, o perfil de temperatura espacial e temporal na câmara de amostra SC pode ser controlado conforme desejado.

No topo da câmara de amostra SC, um arranjo de sensor é disposto, consistindo de um arranjo retangular de elementos de sensor SE individuais que estão em alinhamento com os elementos de aquecimento HE. Os elementos de sensor SE podem medir uma propriedade observável dos rótulos 12 que são parte dos reagentes 10, onde citada propriedade muda se a reação entre o reagente 10 e as moléculas alvo 20 correspondentes ocorrem.

Na realização mostrada na Figura 1, a propriedade observável dos rótulos 12 é a fluorescência. A fluorescência destes rótulos é excitada com uma luz posterior BL, arranjada abaixo do arranjo de aquecimento (transparente). Para alcançar uma alta intensidade de excitação, a luz posterior preferivelmente compreende LEDs ou lasers. A luz fluorescente emitida pelos rótulos 12 pode ser detectada pelos elementos de sensor SE associados de um modo resolvido espacialmente. Se nenhuma substância alvo 20 estiver presente, a medição da fluorescência permite verificar a distribuição e quantidade de reagentes 10 imobilizados na superfície de reação RS.

Os reagentes rotulados 10 e substâncias alvo específicas 20 são opcionalmente projetados de tal modo que a substância alvo compreende um resfriador 24 que interrompe a fluorescência dos rótulos 12 se a substância alvo é ligada ao reagente. O resultante declínio da fluorescência então provê uma medida da quantidade de substância alvo ligada.

Incluindo um arranjo discreto de foto-sensores SE juntamente com um arranjo de aquecimento discreto, um sistema plenamente integrado, “pixelado (em pixéis)” pode ser obtido. O arranjo de foto-sensores pode ser baseado em tecnologia CCD ou CMOS e pode em geral ser posicionado abaixo ou acima da superfície de reação RS. Alternativamente, os foto-sensores podem compreender fotodiodos ou foto-TFTs (transistores de filme fino com metal de porta transparente). Em uma realização preferida, o arranjo de aquecimento e arranjo de foto-sensor são baseados em tecnologia de eletrônica de área grande e princípios de matriz ativa (por exemplo, poli silício de baixa temperatura - LTPS). Um arranjo baseado em princípios de matriz ativa pode, por exemplo, ser incorporado como um componente do dispositivo sensor. Tal dispositivo é preferivelmente fabricado por meio de uma das tecnologias de eletrônica de área grande bem conhecidas, tais como a-Si (silício amorfo), tecnologias de semicondutor LTPS ou orgânico. Um TFT, diodo ou MIM (metal-isolante-metal) poderia ser usado como um elemento ativo. A tecnologia de matriz ativa é comumente usada no campo de visores de painel plano para o controle de muitos efeitos de visualização, por exemplo, visores LCD, OLED e eletroforéticos, e provê um método de custo efetivo para fabricar um módulo bioquímico descartável compreendendo, por exemplo, um arranjo de sensor e um arranjo de processamento térmico. Em adição, as tecnologias de matriz ativa permitem integração efetiva em custo de componentes (por exemplo, sensores de temperatura, eletrodos para manipulação de partícula elétrica) diferentes daqueles usados para controle de temperatura e sensor óptico. Isto é

vantajoso, pois bio-chips, ou sistemas similares, podem conter uma multiplicidade de componentes, cujo número somente aumentará à medida que os dispositivos se tornem mais efetivos e mais versáteis.

Os foto-sensores SE e elementos de aquecimento HE são  
5 opcionalmente posicionados no topo do mesmo substrato.

Uma vantagem de um dispositivo sensor em forma de arranjo integrado é a possibilidade de produzir um cartucho de PCR selado, plenamente integrado, que somente requer conexões elétricas externas (robustez aumentada). Isto permite aplicações portáteis, por exemplo, um  
10 dispositivo de leitura portátil. Ainda mais, óptica complexa e dispendiosa em um dispositivo mãe de leitura não é mais necessária, e detecção rápida, em tempo real é possível; todas as áreas dentro das câmaras de amostra podem ser monitoradas continuamente e simultaneamente.

Como a hibridização de produtos de fragmentos de ácido  
15 nucleico para sondas é dependente da temperatura, hibridizações perfeitas podem ser distinguidas de más combinações de nucleotídeo simples a uma temperatura crítica. Portanto, o controle preciso de temperatura é essencial em um micro sensor de hibridização. A especificidade da ligação pode ser determinada efetuando uma assim chamada curva de fusão. A hibridização é  
20 executada a uma temperatura mais baixa que a ótima (coincidências sub perfeitas são permitidas). A temperatura é então lentamente aumentada enquanto o sinal de fluorescência é constantemente medido. Cada má combinação derreterá a uma temperatura específica, até que somente os fragmentos de ácido nucleico que são perfeitamente complementares à sonda  
25 permaneçam ligados. Isto permite a determinação da especificidade de ligação.

O procedimento anteriormente mencionado pode ser particularmente efetuado com o dispositivo de sensor microeletrônico de acordo com a Figura 1, que compreende um controle de temperatura na forma

de arranjo. Cada elemento deste arranjo de dispositivo é preferivelmente revestido com uma sonda de ácido nucleico 10 diferente. Uma combinação de recursos de fragmentos de ácido nucleico 20 pode então ser aplicada à câmara de hibridização SC e ligada às moléculas de sonda 10. Se a temperatura de cada elemento do arranjo é aumentada até a temperatura ótima para cada sonda, fragmentos de ácido nucleico não ligados podem ser lavados.

Em uma realização preferida, o arranjo de aquecimento compreende um elemento de aquecimento HE (por exemplo, elemento de aquecimento resistivo, TFT, Peltier, etc.) por elemento do arranjo de dispositivo (isto é, região univocamente revestida na superfície de reação). Em adição, um ou diversos sensores de temperatura (por exemplo, baseados em uma mudança de resistência, características e junção p-n, características de TFT, termopar, etc.) podem ser integrados no arranjo. Este sensor ou sensores pode prover leitura da temperatura real. Ainda mais, uma malha de realimentação fechada no arranjo pode ser usada para controlar a temperatura, sem a necessidade de controladores externos.

Em uma outra realização, elementos de bombeamento/mistura (por exemplo, eletrodos) podem ser integrados no dispositivo de sensor microeletrônico de temperatura controlada para manipulação de partículas e/ou para induzir convecção local, por exemplo, com base em princípios de eletro cinética (por exemplo, eletroforese, eletro-osmose, dielectroforese, etc.). Isto pode melhorar vantajosamente a cinética de ligação de fragmentos de ácido nucleico com a superfície de reação.

Uma vantagem do controle de temperatura “em pixéis” é portanto, a possibilidade de efetuar análise precisa da curva de fusão em um formato de arranjo de hibridização. Isto torna possível distinguir entre ligação específica e não específica. Ainda mais, a temperatura ótima pode ser ajustada individualmente para cada sonda, assegurando melhor cinética de ensaio e hibridização mais rápida. Finalmente, o controle de temperatura “em pixéis”

torna possível efetuar PCRs multiplexadas anexadas à superfície (“estado sólido”), conforme descrito abaixo com referência à Figura 4.

Figura 2 ilustra uma possível subdivisão da superfície de reação RS em compartimentos CP que são separados por paredes WA. As paredes WA evitam mistura não controlada de fluido de amostra entre os compartimentos. Dependendo das exigências, as seguintes realizações são possíveis: (i) a câmara de amostra SC inteira do chip de micro-sensor é construída como uma câmara única; (ii) cada unidade associada a um elemento de aquecimento/elemento sensor é construída como uma câmara única; ou (iii) números diferentes das unidades anteriormente mencionadas são construídos como uma câmara única. O uso de diferentes compartimentos na câmara SC torna possível escolher diferentes condições de PCR (tampão) simultaneamente no mesmo chip.

O revestimento da superfície de reação RS com reagentes alvo específicos (moléculas de sonda) pode ser feito, por exemplo, usando impressão a jato de tinta ou tecnologia litográfica. É portanto, desejável ser capaz de controlar a quantidade de material depositado em cada foco da superfície de reação RS. Conforme já mencionado, isto pode ser obtido anexando um corante fluorescente como um rótulo para as moléculas de sonda. Em segundo lugar, é também desejável ser capaz de controlar quanto a ligação não específica (aderência) de produtos PCR rotulados à superfície de reação. Isto pode ser obtido tirando vantagem do princípio de FRET (transferência de energia por ressonância de fluorescência), que é ilustrado na Figura 3. O reagente alvo específico 10 consiste, neste caso, de uma sonda de hibridização 11 anexada via uma ligação 13 à superfície de reação RS e levando o rótulo fluorescente 12.

A substância alvo 20 é preparada começando em um estágio A pela amplificação por PCR com um iniciador 21 portando um rótulo fluorescente 22, que se ligada ao filamento padrão 23. O produto de PCR,

DNA de filamento duplo resultante é então fundido no estágio B para liberar o filamento amplificado 20 que é a substância alvo do processo de detecção no estágio C. O filamento 20 pode ser amplificado adicionalmente por ciclos de PCR repetidos ou por ciclos repetidos de amplificação linear. O filamento 5 20 é capaz de hibridizar com a molécula de sonda 11 trazendo as duas moléculas de corante 12 e 22 em contato próximo. Excitando a molécula de corante anexada a sonda 12, a molécula de corante anexado a iniciador 22 é excitada via FRET e emite luz detectável. (Alternativamente, FRET pode ser usado de outro modo, isto é, o rótulo fluorescente 22 do iniciador 21 é 10 excitado, e a molécula de corante de sonda anexada 12 é detectada. Isto tipicamente apresentará menos segundo plano, uma vez que os fluoróforos 22 estão somente presentes (e então excitáveis) se o produto PCR está presente).

Daí, o uso de reagente alvo específico rotulado 10 e um iniciador rotulado 22 dos quais o último pode ser excitado, excitando a 15 molécula de corante de sonda anexada 12 via FRET, permite ambos controle da quantidade de moléculas de sonda manchadas na superfície de reação RS durante o processo de fabricação e uma detecção fortemente reduzida de produtos PCR não especificamente ligados à superfície de reação.

Em uma realização adicional, o iniciador rotulado 21 pode 20 compreender um resfriador ao invés de uma molécula de corante (22), de tal modo que na ligação (específica) de produtos PCR à superfície de reação, a fluorescência da sonda rotulada 10 é extinta.

Já foi mencionado que é possível fazer uma PCR de “estado sólido” (anexada a superfície) com um controle de temperatura localizado. Ao 25 invés de anexar um oligonucleotídeo de sonda, um (ou ambos) iniciador(s) PCR é(são) anexado(s) a uma superfície sólida neste caso. Um exemplo desta abordagem é ilustrado na Figura 4, onde um iniciador Scorpion é anexado à superfície de reação. Este tipo de iniciador funciona como um iniciador PCR e uma sonda de hibridização e é muito adequado para detecção PCR em

tempo real rápida, com excelente potência discriminatória (de más combinações de base única). Um Scorpion consiste de uma seqüência de sonda específica que é mantida em uma conformação de malha de “grampo de cabelo” por seqüências raiz complementares dos lados 5’ e 3’ da sonda. Um

5 fluoróforo 12 (servindo como rótulo) é anexado à extremidade 3’ da malha. A estrutura em malha “grampo de cabelo” é ligada à extremidade 5’ de um iniciador 15 via tampão PCR 14. O tampão PCR funciona como um resfriador para o fluoróforo 13. O Scorpion é ligado a uma superfície de reação sólida RS via porção de ligante 13 que é anexada ao tampão PCR 14.

10 No estágio A, uma molécula padrão 20 se ligada ao iniciador 15 e é alongada durante a amplificação por PCR. Após o alongamento ter sido completado (estágio B), o padrão 20 é fundido a partir do amplicon 16. Quando a temperatura é abaixada, a seqüência de sonda específica 11 é capaz de ligar seu complemento no amplicon 16 (estágio C). A hibridização abre a

15 malha em “grampo de cabelo” de tal modo que a fluorescência do rótulo 12 não é mais extinta e um sinal fluorescente pode ser medido. O tampão PCR 14 evita leitura através, que poderia conduzir a uma abertura da malha em “grampo de cabelo” na ausência de padrão específico. Isto então evita sinais falsos a partir de produtos PCR não específicos, tais como dímeros iniciantes

20 ou eventos de desiniciação. O número de iniciadores Scorpion anexados a superfície de reação RS (por exemplo, densidade média x área de superfície) deveria pelo menos exceder o número de fluoróforos necessários para fazer um sinal fluorescente maior que o sinal limite ajustado para a análise por PCR em tempo real.

25 As vantagens do esquema descrito compreendem:

- O uso de iniciadores Scorpion traz especificidade dupla ao sistema: ambas seqüência de iniciador e seqüência de sonda precisão coincidir, no sentido de se obter um sinal. Como iniciador e sonda são combinados em uma molécula, iniciadores Scorpion tem mostrado

desempenho superior a outros métodos de detecção em tempo real (por exemplo, sondas Taqman ou sinalizadores moleculares) sob condições de ciclagem rápida.

- O pequeno volume de espaço da PCR acima de cada pixel torna o ciclo extremamente rápido possível, o que reduz o tempo necessário para o ensaio inteiro. Em adição, custos de materiais bioquímicos (iniciadores, enzimas) são reduzidos.

- PCR em estado sólido pode ser facilmente combinada com um sensor de detecção “em pixéis”, criando um sistema PCR integrado.

- Usar diferentes fluoróforos ou diferentes localizações na superfície permite detecção multiplexada (isto é, detecção de alvos diferentes).

Na realização descrita (como também em outras realizações descritas nesta descrição), ambos iniciadores podem ser específicos de seqüência ou um iniciador pode ser um iniciador de banda larga. Ainda mais, um dos iniciadores pode ser anexado a superfície enquanto o outro iniciador pode ser solúvel, ou ambos iniciadores podem ser anexados à superfície. Em uma realização adicional, uma mistura de iniciadores direto (por exemplo, Scorpion) e reverso é depositada (por exemplo, por impressão a jato de tinta) na superfície de reação. Isto contorna a necessidade de compartimentar o arranjo PCR, pois ambos filamentos direto e reverso do produto PCR permanecem anexados à superfície. Câmaras PCRs não compartimentadas são mais simples de construir e proverão melhor sensibilidade com amostras contendo concentrações padrão muito baixas.

Para todas as realizações da invenção, as seguintes informações adicionais são:

- As moléculas de sonda 10 podem compreender um oligonucleotídeo DNA, RNA, PNA (ácido nucleico peptídeo), LNA (ácido nucleico travado), ANA (ácido arabinonucleico) ou HNA (ácido nucleico



hexitol).

- RNA, PNA, LNA e HNA são capazes de formar heteroduplexes com DNA que são mais estáveis que homoduplexes DNA:DNA. Isto assegura capacidade de discriminação melhorada para má  
5 combinação de seqüências (hibridização mais específica). A maior estabilidade de heteroduplexes também permite o uso de sondas oligonucleotídicas mais curtas a uma dada temperatura, reduzindo a chance de ligação não específica.

- A formação de duplexes PNA:DNA é independente da força  
10 iônica do buffer de hibridização. Isto torna possível usar tampões de baixo teor de sal para evitar renaturação indesejada de amplicons dsDNA por PCR.

- Enquanto as realizações foram exemplificadas na maioria para identificação de DNA microbial, os métodos são também aplicáveis a outros assuntos de multiplexação como genotipagem, traçar o perfil de  
15 expressão de gene, etc.

Ainda mais, as realizações foram exemplificadas principalmente com detecção fluorescente. Evidentemente, outros meios de detecção (magnéticos, luminescência, absorção, refletância) são também factíveis para algumas das realizações (com a exceção da detecção baseada  
20 em FRET).

Em resumo, a invenção descreve a possibilidade de usar várias características avançadas para detecção PCR do tipo micro arranjo:

- Detecção baseada em FRET com as vantagens principais de ser capaz de validar produção de superfície de reação e especificidade  
25 melhorada, reduzindo sinais falso-positivos.

- Controle de temperatura localizado com as vantagens principais de ser capaz de reforçar a especificidade, controlando a temperatura de hibridização ótima para cada elemento do arranjo da superfície de reação, e sendo capaz de efetuar PCR em estado sólido.

- PCR em estado sólido com a vantagem principal de ser capaz de efetuar multiplexação PCR em tempo real miniaturizada em um sistema integrado.

- Um detector “em pixéis” integrado com a vantagem principal de ser capaz de fazer um cartucho de PCR plenamente integrado e robusto que não requer uma máquina mãe de leitura com óptica sofisticada.

Finalmente, é ressaltado que, no presente pedido, o termo “compreendendo” não exclui outros elementos e etapas, que “um” ou “uma” não exclui diversos, e que um único processador ou outra unidade podem satisfazer as funções de vários meios. A invenção reside em cada e toda característica nova e cada e toda combinação de características. Ainda mais, sinais de referência nas reivindicações não serão considerados como limitando seu escopo.

## REIVINDICAÇÕES

1. Dispositivo de sensor microeletrônico para investigação de pelo menos uma substância alvo biológica (20), caracterizado pelo fato de compreender:

5                   a) câmara de amostra (SC) contendo pelo menos um reagente alvo específico (10) onde o reagente e/ou a substância alvo específica (20) compreende um rótulo (12) que muda uma propriedade observável se o reagente (10) reage com a substância alvo (20);

10                   b) componente de sensor (SE) para detectar a propriedade observável do rótulo (12);

                    c) componente de aquecimento (HE) para trocar calor com pelo menos uma sub região da câmara de amostra (SC);

                    d) unidade de controle (CU) para acionar seletivamente o componente de aquecimento (HE);

15                   e que a substância alvo biológica e o reagente alvo específico compreendem oligonucleotídeos, preferivelmente DNA, RNA, PNA, LNA, ANA, ou HNA; e

                    e que a câmara de amostra (SC) compreende uma superfície de reação (RS) que é coberta com o reagente alvo específico;

20                   e que dito reagente alvo específico (10) compreende um iniciador para um processo de PCR em que dito iniciador é fixado à superfície de reação (RS).

2. Dispositivo de sensor microeletrônico de acordo com a reivindicação 1,

25                   caracterizado pelo fato de que dito reagente alvo específico (10) é um iniciador scorpion compreendendo um iniciador de PCR (15) e uma sonda de hibridização (11) em que dito iniciador scorpion é fixado à dita superfície de reação (RS).

3. Dispositivo de sensor microeletrônico de acordo com a

reivindicação 1,

caracterizado pelo fato de que a propriedade observável do rótulo (12) compreende luminescência, particularmente fluorescência, fosforescência ou eletroluminescência, magnetização, absorção, colorimetria e/ou refletância.

4. Dispositivo de sensor microeletrônico de acordo com a reivindicação 1,

caracterizado pelo fato de que a propriedade observável do rótulo (12) está presente se o reagente alvo específico (10) não tiver reagido com a substância alvo (20).

5. Dispositivo de sensor microeletrônico de acordo com a reivindicação 1,

caracterizado pelo fato de que a fluorescência do rótulo (12) é extinta se o reagente alvo específico (10) tiver reagido com a substância alvo (20).

6. Dispositivo de sensor microeletrônico de acordo com a reivindicação 1,

caracterizado pelo fato de que a fluorescência do rótulo (12) é mudada pela transferência de energia de ressonância de fluorescência (FRET) para um rótulo fluorescente (22) da substância alvo (20) e/ou reagente alvo específico (10), se o reagente alvo específico (10) tiver reagido com a substância alvo (20).

7. Dispositivo de sensor microeletrônico de acordo com a reivindicação 1,

caracterizado pelo fato de que o reagente alvo específico (10) compreende o rótulo (12) e que sua presença na câmara de amostra (SC) é controlada medindo a propriedade observável do rótulo (12).

8. Dispositivo de sensor microeletrônico de acordo com a reivindicação 1,

caracterizado pelo fato de que componente de aquecimento compreende um arranjo de aquecimento com diversos elementos de aquecimento (HE).

5 9. Dispositivo de sensor microeletrônico de acordo com a reivindicação 8,

caracterizado pelo fato de que a câmara de amostra (SC) compreende uma superfície de reação (RS) e as diferentes espécies de reagentes alvo específicos (10) são distribuídas através da superfície de reação (RS) em uma configuração que está em alinhamento com o arranjo de aquecimento.

10

10. Dispositivo de sensor microeletrônico de acordo com a reivindicação 1,

caracterizado pelo fato de que a câmara de amostra (SC) compreende compartimentos de reação (CP).

15 11. Dispositivo de sensor microeletrônico de acordo com a reivindicação 8 e reivindicação 10,

caracterizado pelo fato de que os compartimentos de reação (CP) estão em alinhamento com os elementos de aquecimento (HE).

20 12. Dispositivo de sensor microeletrônico de acordo com a reivindicação 1,

caracterizado pelo fato de que o componente de sensor compreende um arranjo de elementos de sensor individuais (SE).

13. Dispositivo de sensor microeletrônico de acordo com a reivindicação 8 e a reivindicação 11,

25 caracterizado pelo fato de que os elementos de sensor (SE) estão em alinhamento com os elementos de aquecimento (HE).

14. Dispositivo de sensor microeletrônico de acordo com a reivindicação 1,

caracterizado pelo fato de que o componente de aquecimento

(HE) compreende uma tira resistiva, um transistor de filme fino TFT, um eletrodo transparente, um elemento de Peltier, um eletrodo de aquecimento de radiofrequência, ou um eletrodo de aquecimento radiativo.

5        15. Dispositivo de sensor microeletrônico de acordo com a reivindicação 1,

caracterizado pelo fato de que compreende pelo menos um sensor de temperatura, que é preferivelmente integrado ao componente de aquecimento.

10       16. Dispositivo de sensor microeletrônico de acordo com a reivindicação 12,

caracterizado pelo fato de que a unidade de controle (CU) é acoplada ao citado sensor de temperatura e adaptada para controlar o componente de aquecimento (HE) em uma malha fechada de acordo com um perfil de temperatura predeterminado na câmara de amostra (SC).

15       17. Dispositivo de sensor microeletrônico de acordo com a reivindicação 1,

caracterizado pelo fato de que compreende um dispositivo micro mecânico ou elétrico, preferivelmente uma bomba (PE) ou uma válvula, para controlar o fluxo de um fluido e/ou o movimento de partículas  
20       na câmara de amostra (SC).

          18. Dispositivo de sensor microeletrônico de acordo com a reivindicação 1,

caracterizado pelo fato de que uma abordagem de matriz eletrônica de grande área, preferivelmente uma abordagem de matriz ativa, é  
25       usada para contactar o componente de aquecimento (HE) e/ou o componente de sensor (SE).

          19. Dispositivo de sensor microeletrônico de acordo com a reivindicação 3,

caracterizado pelo fato de que a superfície de reação (RS)

compreende a superfície de uma membrana porosa.

20. Dispositivo de sensor microeletrônico de acordo com a reivindicação 3,

5 caracterizado pelo fato de que a superfície de reação (RS) fica adjacente ao componente de aquecimento (HE).

21. Dispositivo de sensor microeletrônico de acordo com a reivindicação 1,

10 caracterizado pelo fato de que, a unidade de controle (CU) é adaptada para acionar o componente de aquecimento (HE), de tal modo que um processo de PCR em estado sólido pode ocorrer na câmara de amostra (SC) de modo a amplificar e investigar a substância alvo.

22. Dispositivo de sensor microeletrônico de acordo com a reivindicação 1,

15 caracterizado pelo fato de que a unidade de controle (CU) é adaptada para acionar o componente de aquecimento (HE) de acordo com a curva de fusão de uma hibridização entre a substância alvo (20) e o reagente (10).

20 23. Método para investigação de pelo menos uma substância alvo biológica (20), caracterizado pelo fato de compreender as seguintes etapas:

a) prover uma câmara de amostra (SC) com pelo menos um reagente alvo específico (10), onde o reagente alvo específico (10) e/ou a substância alvo (20) compreende um rótulo (12) que muda uma propriedade observável se o reagente (10) reage com a substância alvo (20);

25 em que substância alvo e o reagente alvo específico compreendem oligonucleotídeos, preferivelmente DNA, RNA, PNA, LNA, ANA, ou HNA; e

em que a câmara de amostra (SC) compreende uma superfície de reação (RS) que é coberta com o reagente alvo específico; em que o dito

reagente alvo específico (10) compreende um iniciador para um processo de PCR em que dito iniciador é fixado à dita superfície de reação (RS);

b) controlar a presença do reagente alvo específico (10) na câmara de amostra (SC);

5 c) reagir substância alvo (20) com o reagente (10);

d) medir a propriedade observável do rótulo (12), durante e/ou após a etapa c);

e que o processo de PCR em estado sólido é executado na câmara de amostra (SC), particularmente em uma superfície de reação (RS).

10 24. Método de acordo com a reivindicação 23,

caracterizado pelo fato de que a temperatura na câmara de amostra (SC) é controlada de acordo com um perfil de temperatura predeterminado, preferivelmente por uma malha fechada.

25. Método de acordo com a reivindicação 23,

15 caracterizado pelo fato de que a temperatura na superfície de reação (RS) é aumentada após a etapa c), de acordo com a curva de fusão de uma hibridização entre a substância alvo (20) e o reagente alvo específico (10).

20 26. Uso do dispositivo de sensor microeletrônico como definido em qualquer das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de ser para diagnóstico molecular, análise de amostra biológica, análise de amostra química, análise de alimento, análise ambiental ou análise forense.



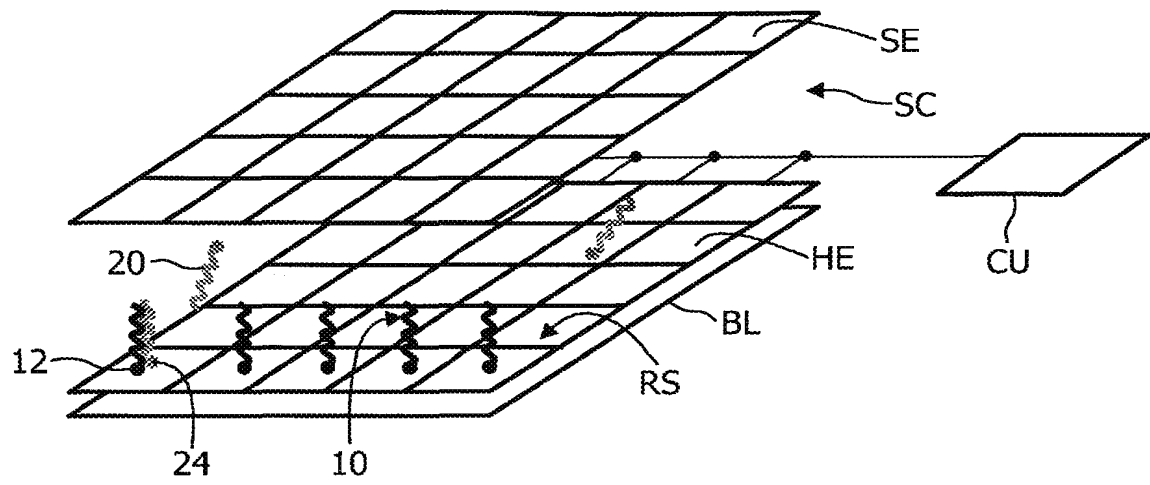


FIG. 1

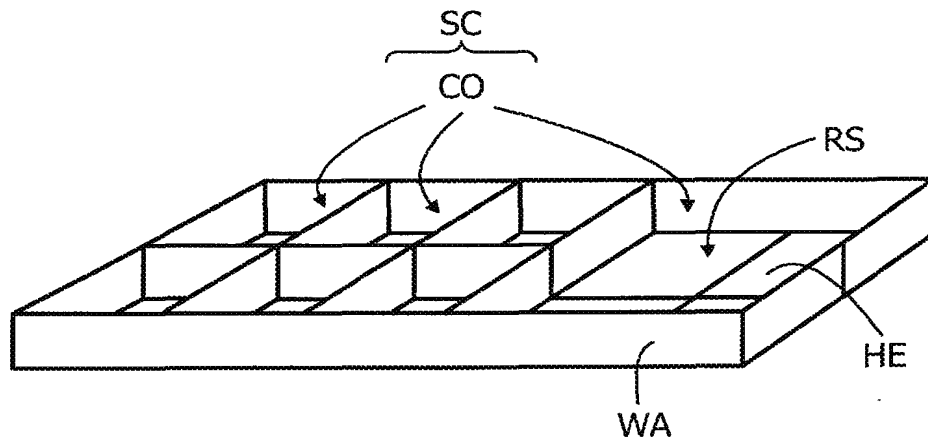


FIG. 2

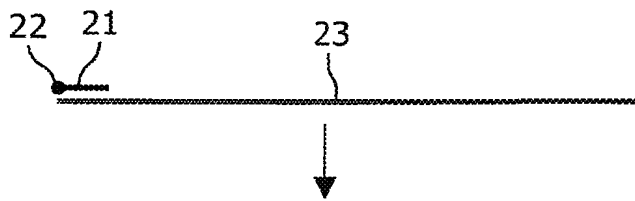


FIG. 3A

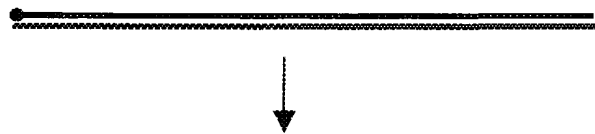


FIG. 3B

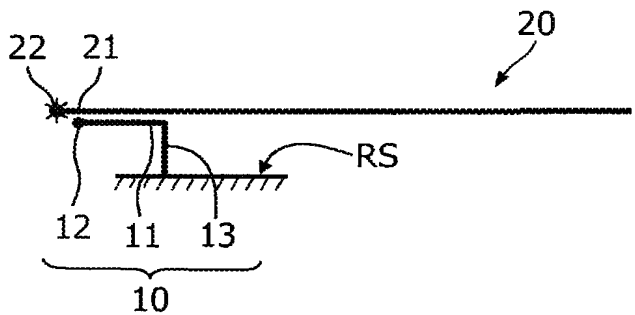


FIG. 3C

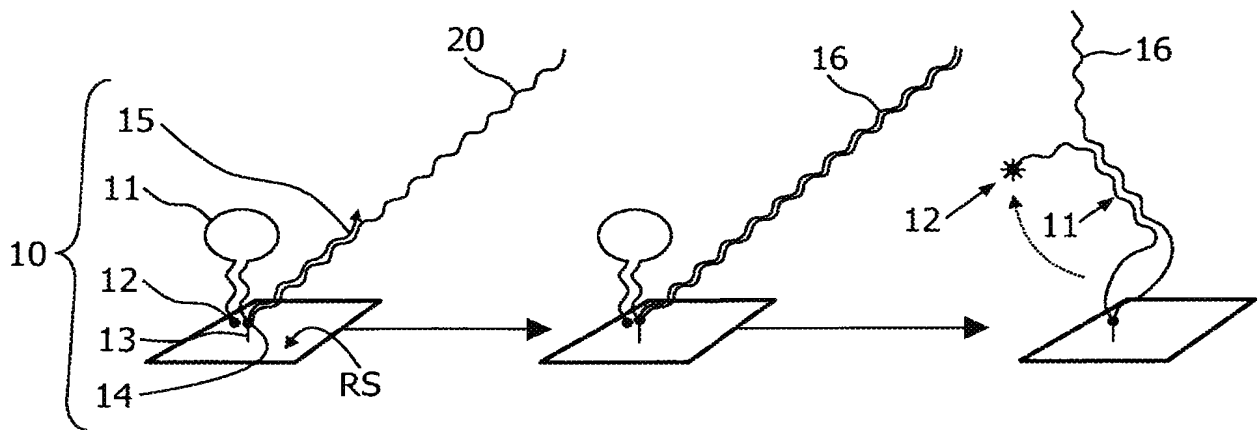


FIG. 4A

FIG. 4B

FIG. 4C

RESUMO

“DISPOSITIVO DE SENSOR MICROELETRÔNICO, MÉTODO PARA INVESTIGAÇÃO DE PELO MENOS UMA SUBSTÂNCIA ALVO BIOLÓGICA, E, USO DO DISPOSITIVO DE SENSOR MICROELETRÔNICO”

A invenção relaciona-se a um dispositivo de sensor microeletrônico e a um método para investigação de substâncias alvo biológicas (20), por exemplo, oligonucleotídeos como fragmentos de DNA. Em uma realização, o dispositivo compreende uma superfície de reação (RS) à qual reagentes alvo específicos (10) são anexados e que fica entre uma câmara de amostra (SC) e um arranjo de elementos de aquecimento (HE) seletivamente controláveis. O perfil de temperatura na câmara de amostra (SC) pode ser controlado conforme desejado, para prover, por exemplo, condições para uma PCR e/ou para uma fusão controlada das hibridizações. O reagente (10) e/ou a substância alvo (20) compreendem um rótulo (12) com uma propriedade observável, como fluorescência que muda se a substância alvo (20) é ligada ao reagente (10), citada propriedade sendo detectada por um arranjo de elementos de sensor, por exemplo, foto sensores (SE). A fluorescência do rótulo (12) pode ser preferivelmente transferida por FRET a um rótulo fluorescente (22) diferente ou extinta se a substância alvo (20) é ligada.