INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

(11) Número de Publicação: **PT 1434880 E**

(51) Classificação Internacional:
C12Q 1/68 (2006.01) ***B01L 7/00*** (2006.01)

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **2002.09.14**

(30) Prioridade(s): **2001.09.15 KR 2001057**
2001.10.30 KR 2001066

(43) Data de publicação do pedido: **2004.07.07**

(45) Data e BPI da concessão: **2007.01.03**
004/2007

(73) Titular(es):
AHRAM BIOSYSTEMS INC.
704 SAMPOONG BUILDING 284-50 SUNGSU 2-GA, 3-DONG SEOUL 133-833 KR

(72) Inventor(es):
HYUN JIN HWANG KR
JEONG HEE KIM KR
KYUNGHOON JEONG KR

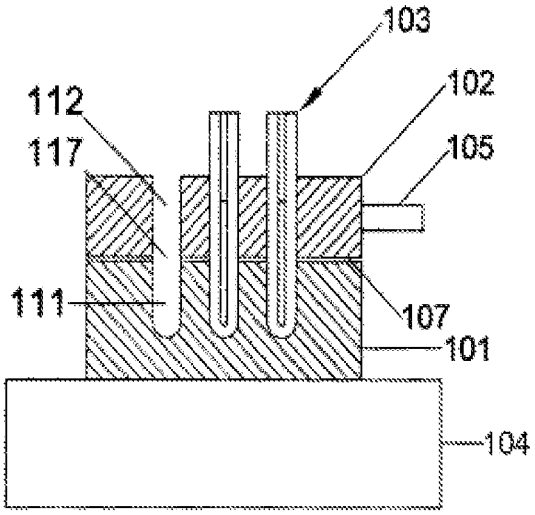
(74) Mandatário:

(54) Epígrafe: **MÉTODO E APARELHO PARA AMPLIFICAÇÃO DE SEQUÊNCIAS DE ÁCIDO NUCLEICO POR UTILIZAÇÃO DE CONVECÇÃO TÉRMICA**

(57) Resumo:

RESUMO

"Método e aparelho para amplificação de sequências de ácido nucleico por utilização de convecção térmica"



O presente invento proporciona um método para amplificação de sequências de ácido nucleico e sua aparelhagem que são de concepção simples e facilmente miniaturizáveis e integráveis em aparelhos complexos, com capacidade de utilizarem ADN-polimerases que não são termoestáveis. No presente invento, combinam-se várias fontes de calor para fornecer ou remover calor de regiões específicas da amostra de modo que se mantenha uma distribuição de temperaturas espacial específica dentro da amostra por localização de uma região com temperatura relativamente elevada a uma altura mais baixa do que uma região de temperatura relativamente baixa.

DESCRIÇÃO

"Método e aparelho para amplificação de sequências de ácido nucleico por utilização de convecção térmica"

Campo técnico

O presente invento refere-se na generalidade a métodos e aparelhos para amplificação de sequências de ácido nucleico. Mais particularmente, refere-se a métodos e aparelhos que utilizam convecção térmica, nos quais os processos de amplificação controlados por temperatura, incluindo a reacção em cadeia com polimerase (PCR) e processos relacionados, podem ser efectuados para amplificar sequências de ácido nucleico alvo de amostras genéticas contendo ADN ou ARN.

Arte anterior

A tecnologia de amplificação de sequências de ácido nucleico tem uma vasta aplicação em biociência, engenharia genética e ciência médica para investigação e desenvolvimento e objectivos de diagnóstico. Nomeadamente, a tecnologia de amplificação de sequências de ácido nucleico utilizando PCR (doravante denominada "tecnologia de amplificação por PCR") tem sido mais vastamente utilizada.

Foram revelados detalhes da tecnologia de amplificação por PCR em Patente US Nº 4 683 202; 4 683 195; 4 800 159; e 4 965 188.

Por exemplo, US 5 270 183 A refere-se a um método de PCR que envolve a injecção de uma mistura reaccional num caudal de fluido transportador, em que o fluido transportador passa seguidamente através de várias zonas de temperatura nas quais ocorrem as reacções em cadeia com polimerase.

Além disso, WO 97/48818 A revela um aparelho para ciclização térmica de uma amostra de ADN, incluindo (i) um suporte; (ii) uma montagem de unidade de aquecimento montada no referido suporte, em que a referida montagem tem um primeiro e segundo elementos de aquecimento definindo uma primeira e segunda câmaras de aquecimento, respectivamente, estando as referidas câmaras adaptadas para receber e pôr em contacto um tubo capilar que se estende ao longo das duas

câmaras de aquecimento; (iii) meios para manter as temperaturas das primeira e segunda câmaras da referida montagem de unidade de aquecimento às primeira e segunda temperaturas elevadas seleccionadas; e (iv) meios para movimentar a amostra sucessivamente no tubo entre as duas câmaras.

Além disso, US 5 919 622 A descreve um sistema para o tratamento de ajuste de temperatura de líquidos especialmente durante o isolamento e amplificação de ácidos nucleicos com um elemento de termostatização reutilizável e um elemento de aquecimento descartável, que facilita a execução de preparação e amplificação de amostra num único vaso.

Foram desenvolvidos vários aparelhos e métodos que incluem processos de amplificação por PCR automatizados e utilizados para amplificação rápida e eficaz de uma variedade de amostras genéticas. O princípio operacional básico de tal tecnologia é o seguinte.

Na tecnologia de amplificação por PCR comercializada, prepara-se uma amostra de modo a conter um ADN molde a ser amplificado, um par de oligonucleótidos iniciadores complementares a uma sequência específica de cada cadeia simples do ADN molde, uma ADN-polimerase termoestável e desoxinucleótido-trifosfatos (dNTP). Uma parte específica da sequência de ácido nucleico do ADN molde é então amplificada por repetição de um ciclo de temperatura que muda sequencialmente a temperatura da amostra. Tipicamente, o ciclo de temperatura consiste de três ou duas etapas de temperatura e os processos de amplificação durante o ciclo de temperatura ocorrem da seguinte forma.

A primeira etapa é a etapa de desnaturação na qual a amostra é aquecida a uma temperatura elevada e os ADN em cadeia dupla separaram-se em ADN em cadeia simples. A segunda etapa é a etapa de hibridação na qual a amostra é arrefecida a uma temperatura baixa e os ADN em cadeia simples formados na primeira etapa se ligam aos iniciadores, formando parcialmente complexos ADN em cadeia simples-iniciador. A última etapa é a etapa de polimerização na qual a amostra é mantida a uma temperatura adequada e os iniciadores nos complexos ADN-

iniciador são estendidos por acção da ADN-polimerase, gerando novos ADN em cadeia simples que são complementares a cada uma das cadeias de ADN molde. As sequências de ácido nucleico alvo, tal como seleccionadas pelas sequências dos dois iniciadores, são replicadas durante cada ciclo que consiste das três etapas supra. Tipicamente, podem ser produzidos vários milhões ou números mais elevados de cópias das sequências de ácido nucleico alvo por repetição do ciclo de temperaturas durante cerca de 20 a 40 vezes.

A temperatura da etapa de desnaturação é tipicamente 90-94°C. A temperatura da etapa de hibridação é controlada adequadamente de acordo com as temperaturas de fusão (T_m) dos iniciadores utilizados e encontra-se tipicamente na gama de 35 a 65°C. Tipicamente, ajusta-se a temperatura da etapa de polimerização a 72°C e utiliza-se um ciclo de temperatura de três etapas, dado que a ADN-polimerase *Taq* mais frequentemente utilizada (uma ADN-polimerase termoestável extraída de *Thermus aquaticus*) apresenta uma actividade óptima a essa temperatura. Também pode ser utilizado um ciclo de temperatura em duas etapas no qual se ajusta a temperatura de polimerização a um valor igual ao da temperatura de hibridação, dado que a ADN-polimerase *Taq* apresenta uma vasta gama de temperaturas de actividade de polimerase.

No método mais largamente utilizado, põe-se em contacto um vaso reaccional contendo a amostra com um bloco de metal sólido com uma elevada condutividade térmica e varia-se a temperatura do bloco de metal sólido por combinação com dispositivos de aquecimento e arrefecimento para atingir o ciclo de temperatura da amostra pretendido. Os produtos comerciais que adoptam este tipo de métodos utilizam frequentemente blocos de prata revestidos a ouro que apresentam uma condutividade térmica muito elevada e/ou o método de arrefecimento de Peltier de modo a atingir uma mudança de temperatura rápida. Recentemente, foram desenvolvidos métodos que usam um fluido, tal como um gás ou líquido, como uma fonte de calor em vez do bloco de metal sólido, de modo a atingir mudança de temperatura rápida e estão a ser comercializados produtos que utilizam tais métodos. Neste tipo de métodos, circula-se um fluido aquecido a uma temperatura adequada em torno do vaso reaccional de modo

a proporcionar um contacto térmico eficaz entre a fonte de calor fluida e o vaso reaccional contendo a amostra. Foram também desenvolvidos outros tipos de métodos para obter ciclos de temperatura rápidos. Constituem exemplos adicionais, entre outros, um método de pôr em contacto o vaso reaccional contendo a amostra ou a própria amostra sequencialmente com várias fontes de calor, cada uma das quais a uma temperatura específica, um método de aquecer a amostra directamente com radiação de infravermelhos, etc.

Os aparelhos de amplificação de sequências de ácido nucleico anteriores apresentam várias desvantagens, dado que funcionam de modo a variar a temperatura de toda a amostra de acordo com o ciclo de temperatura em três etapas ou em duas etapas.

Primeiramente, os aparelhos de amplificação de sequências de ácido nucleico anteriores do tipo de ciclo de temperatura apresentam uma concepção complexa, dado que são necessários processos para mudar a temperatura da amostra. De modo a efectuar tais processos de mudança de temperatura, o método que inclui um bloco de metal sólido ou um fluido como fonte de calor necessita de um meio para controlar e mudar a temperatura da fonte de calor rápida e uniformemente e também de um meio para controlar o intervalo de tempo da mudança de temperatura. De igual modo, o método de colocar em contacto o vaso reaccional ou da amostra sequencialmente com várias fontes de calor, cada uma das quais a uma temperatura específica, requer um meio para mover o vaso reaccional ou a amostra rápida e precisamente e também um meio para controlar o tempo e intervalo de tempo do movimento.

Em segundo lugar, é difícil integrar os aparelhos de amplificação de sequências de ácido nucleico anteriores num aparelho complexo ou num dispositivo miniaturizado, devido à sua concepção complicada. Recentemente, encontram-se em desenvolvimento aparelhos complexos miniaturizados no campo da biotecnologia.

Por exemplo, foi desenvolvido “Lab-on-a-chip” por integração de canais para passagem da amostra, válvulas, manómetros, vasos reaccionais, unidades de detecção, etc. como

uma unidade única numa placa de vidro, silício ou polímero utilizando fotolitografia. Espera-se que tais aparelhos complexos miniaturizados apresentem vastas aplicações para vários objectivos de investigação e médicos. No caso de ser necessário integrar um aparelho de amplificação de sequências de ácido nucleico em tal *chip* miniaturizado, o método anterior apresenta uma desvantagem relativamente a miniaturização porque requer uma concepção complexa de modo a permitir os processos de mudança de temperatura. Além disso, é difícil integrar os aparelhos anteriores num aparelho complexo em que não seja desejável uma mudança de temperatura rápida.

Em terceiro lugar, os aparelhos de amplificação de sequências de ácido nucleico anteriores só podem utilizar ADN-polimerases termoestáveis, tais como ADN-polimerase *Taq*. Tal deve-se ao facto dos aparelhos anteriores utilizarem o processo de aquecer toda a amostra a uma temperatura elevada.

Finalmente, os aparelhos de amplificação de sequências de ácido nucleico anteriores apresentam uma limitação para reduzir o tempo da reacção de PCR. Dado que os aparelhos anteriores requerem os processos para mudar a temperatura de toda a amostra, o tempo da reacção de PCR deve levar mais tempo, pelo menos tanto tempo quanto o necessário para a mudança de temperatura.

Revelação do invento

Pretende-se que o presente invento resolva os problemas supra. É um objectivo do presente invento proporcionar um novo método de amplificação de sequências de ácido nucleico e aparelhos derivados baseado em convecção térmica. O novo método e aparelhos de acordo com o presente invento executa amplificação de sequências de ácidos nucleico por formação de várias regiões específicas com diferentes temperaturas dentro da amostra, causando consequentemente a ocorrência de convecção térmica natural da amostra como resultado do gradiente de temperatura entre as diferentes regiões.

É também um objectivo do presente invento proporcionar um método e aparelhos derivados que são mais simples na sua concepção e não requerem componentes complexas tal como um meio para variar a temperatura de uma forma controlada e um

meio para controlar o intervalo de tempo da mudança de temperatura, tal como necessário nos métodos e aparelhos de ciclização de temperatura anteriores.

Assim, constitui outro objectivo do presente invento proporcionar um método de amplificação de sequências de ácido nucleico e aparelhos derivados que são mais simples do que a arte prévia de modo a poderem ser facilmente miniaturizados e assim integrados em aparelhos miniaturizados complexos, tais como “Lab-on-a-chip”.

Constitui ainda outro objectivo do presente invento proporcionar um método de amplificação de sequências de ácido nucleico e aparelhos derivados baseados na convecção térmica, no qual podem ser utilizadas não são as ADN-polimerases termoestáveis como também as ADN-polimerases não termoestáveis.

É ainda um objectivo adicional do presente invento proporcionar um método de amplificação de sequências de ácido nucleico e aparelhos derivados mais eficazes que não necessitam dos processos de mudança de temperatura necessários na arte prévia.

Outros objectivos e vantagens do invento tornar-se-ão aparentes aos peritos na arte a partir da seguinte descrição detalhada, reivindicações e esquemas.

De modo a atingir os objectivos supra, o presente invento proporciona um novo método de amplificação de sequências de ácido nucleico e aparelhos derivados baseados no novo princípio de funcionamento do tipo de convecção térmica descrito infra.

Para atingir os objectivos supra, o presente invento proporciona um método de amplificação de sequências de ácido nucleico utilizando PCR, em que o método inclui:

uma etapa de injecção para um vaso reaccional de uma amostra contendo um ADN molde contendo as sequências de ácido nucleico alvo a amplificar, ADN-polimerase, desoxiadenosina-trifosfato, desoxicitidina-trifosfato, desoxiguanosina-trifosfato, desoxitimidina-trifosfato e pelo menos dois oligonucleótidos

iniciadores complementares a cada terminal 3' de cada uma das sequências de ácido nucleico alvo;

e uma etapa de manutenção de uma distribuição de temperaturas espacial específica na amostra através do contacto térmico da amostra com várias fontes de calor que fornecem calor a, ou removem calor de, regiões específicas da amostra de modo que uma região de temperatura relativamente elevada esteja a uma altura mais baixa do que uma região de temperatura relativamente baixa,

em que a distribuição de temperaturas espacial específica inclui regiões espaciais específicas cada uma das quais cumprindo uma condição de temperatura adequada para (i) uma etapa de desnaturação em que os ADN em cadeia dupla se separam em ADN em cadeia simples, (ii) uma etapa de hibridação na qual os ADN em cadeia simples formados na etapa de desnaturação hibridam com os iniciadores para formar complexos ADN-iniciador ou (iii) uma etapa de polimerização na qual os iniciadores nos complexos ADN-iniciador são estendidos pela reacção de polimerização

e em que a distribuição de temperaturas espacial específica é uma distribuição de temperaturas que induz circulação da amostra por convecção térmica de modo que as etapas de desnaturação, hibridação e polimerização ocorram sequencial e repetidamente dentro da amostra.

Para atingir os objectivos supra, o presente invento proporciona um aparelho de amplificação de sequências de ácido nucleico utilizando PCR, em que o aparelho inclui:

várias fontes de calor que podem fornecer calor ou remover calor de várias regiões específicas numa amostra contida num vaso reaccional,

em que as fontes de calor têm um arranjo que permite manter uma distribuição de temperaturas espacial específica na amostra, de modo que uma região de temperatura relativamente elevada esteja localizada a uma altura mais baixa do que uma região de temperatura relativamente baixa,

em que a distribuição de temperaturas espacial específica inclui regiões espaciais específicas cada uma das quais cumprindo uma condição de temperatura adequada para (i) uma etapa de desnaturação em que os ADN em cadeia dupla se separam

em ADN em cadeia simples, (ii) uma etapa de hibridação na qual os ADN em cadeia simples formados na etapa de desnaturação hibridam com os iniciadores para formar complexos ADN-iniciador ou (iii) uma etapa de polimerização na qual os iniciadores nos complexos ADN-iniciador são estendidos pela reacção de polimerização,

e em que a distribuição de temperaturas espacial específica é uma distribuição de temperaturas que induz circulação da amostra por convecção térmica de modo que as etapas de desnaturação, hibridação e polimerização ocorram sequencial e repetidamente dentro da amostra.

No presente invento, geram-se regiões espaciais no interior do vaso reaccional contendo a amostra, regiões nas quais podem ocorrer as etapas de desnaturação, hibridação e polimerização sequencial e repetidamente. De modo a conseguir tal, combinam-se várias fontes de calor para fornecer calor ou para remover calor das regiões específicas da amostra e além disso uma região de temperatura relativamente elevada está localizada a uma altura mais baixa do que uma região de temperatura relativamente baixa. Tal resulta na formação de uma convecção térmica natural como consequência do gradiente de temperatura entre as regiões específicas, causando assim circulação da amostra entre as diferentes regiões de temperatura. Assim, podem ocorrer as etapas de desnaturação, hibridação e polimerização sequencial e repetidamente, resultando em amplificação de sequências de ácido nucleico.

Tal como descrito, os aparelhos de amplificação de sequências de ácido nucleico do presente invento baseiam-se no método de convecção térmica e a sua concepção apresenta as seguintes características. Em primeiro lugar, o aparelho do presente invento requer várias fontes de calor que possam manter várias regiões de temperatura específicas na amostra dentro do vaso reaccional a temperaturas seleccionadas. Em segundo lugar, deve posicionar-se uma região de temperatura relativamente elevada a uma altura inferior a uma região de temperatura relativamente baixa, de modo a induzir circulação da amostra entre as regiões de temperatura específicas através de convecção térmica. Mais especificamente, a amostra na região de temperatura elevada tem uma densidade mais baixa do que na região de temperatura baixa. Assim, gera-se uma força

ascensional que causa o movimento da amostra da região de temperatura elevada na posição baixa para a região de temperatura baixa na posição mais alta, enquanto que a força da gravidade causa o movimento da amostra na direcção oposta. Gera-se assim uma convecção térmica natural pela diferença de temperatura, resultando em circulação da amostra entre as regiões de temperatura específicas.

Finalmente, as temperaturas das regiões de temperatura específicas devem ser seleccionadas de modo que se possam formar na amostra regiões espaciais, nas quais podem ocorrer as etapas de desnaturação, hibridação e polimerização em cada região e também de modo que as três etapas possam ser efectuadas sequencial e repetidamente por circulação induzida por convecção térmica da amostra entre as regiões de temperatura específicas a uma velocidade adequada.

Os objectivos, características e vantagens descritas supra tornar-se-ão aparentes a partir da seguinte descrição detalhada proporcionada em relação com os esquemas anexos. Na descrição do presente invento, será omitida a explicação detalhada da arte prévia relacionada quando tal torne os aspectos do presente invento desnecessariamente ambíguos.

Descrição sucinta dos esquemas

A figura 1 apresenta um diagrama esquemático do princípio de funcionamento do método de amplificação de sequências de ácido nucleico baseado na convecção térmica.

As figuras 2a e 2b apresentam digramas esquemáticos dos casos contendo mais de três regiões de temperatura específicas na amostra.

As figuras 3a e 3b apresentam uma vista de secção transversal e uma vista em perspectiva, respectivamente, do aparelho de amplificação de sequências de ácido nucleico de acordo com o presente invento.

A figura 4 apresenta a distribuição de temperaturas da amostra a várias alturas do vaso reaccional.

A figura 5 é uma fotografia do resultado de electroforese ilustrativo dos resultados do exemplo 1, a vários tempos de reacção.

A figura 6 é uma fotografia do resultado de electroforese ilustrativo dos resultados do exemplo 2 para cada par de iniciadores.

A figura 7 é uma fotografia do resultado de electroforese ilustrativo dos resultados do exemplo 3, a vários tempos de reacção.

Explicação da numeração das partes importantes dos esquemas

1, 1': Região de temperatura elevada
2, 2': Região de temperatura baixa
3, 4, 3', 4': Fonte de calor
5: Região de convecção
6: Vaso reaccional
101: Primeiro bloco de condução
102: Segundo bloco de condução
103: Vaso reaccional
104: Dispositivo de aquecimento
105: Entrada do fluido de controlo de temperatura
106: Saída do fluido de controlo de temperatura
107: Isolante
112,117: Orifício de passagem
111: Abertura

Melhor forma de levar o invento à prática

Explicam-se detalhadamente infra as concretizações preferidas de acordo com o presente invento com referência aos esquemas em anexo.

A figura 1 apresenta um diagrama esquemático do princípio de funcionamento do método de amplificação de ácido nucleico baseado na convecção térmica. A concretização apresentada na figura 1 exemplifica o caso em que se utiliza um tubo direito com a sua extremidade fechada como um vaso reaccional e geram-se duas regiões de temperatura específicas 1 e 2. Contudo, tal como apresentado nas concretizações representadas na figura 2,

podem ser utilizados vasos reaccionais com formas modificadas e podem ser geradas três ou mais regiões de temperatura específicas. Deve ser aparente aos peritos na arte que podem ser consideradas várias modificações incluindo, as descritas supra, baseadas no princípio de funcionamento de convecção térmica do método de amplificação de ácido nucleico de acordo com o presente invento.

Numa concretização apresentada na figura 1, o vaso reaccional está em contacto térmico com duas fontes de calor 3 e 4 que fornecem calor ou removem calor das regiões específicas 1 e 2 na amostra, directa ou indirectamente através da parede do vaso reaccional, formando assim uma distribuição de temperaturas espacial na amostra. A distribuição de temperaturas assim formada permite a ocorrência das três etapas, as etapas de desnaturação, hibridação e polimerização, necessárias para PCR. Entre as duas regiões 1 e 2 com temperaturas diferentes, a região 1 com temperatura relativamente elevada está posicionada a uma altura inferior à região 2 de temperatura relativamente baixa.

A diferença de temperatura gera diferença de densidade na amostra. A força ascendente exercida na amostra de baixa densidade na região 1 de temperatura elevada e a força da gravidade exercida na amostra de densidade elevada na região 2 de temperatura baixa geram uma convecção térmica da amostra. Assim, a amostra circula naturalmente entre as diferentes regiões espaciais em cada uma das quais podem ocorrer as etapas de desnaturação, hibridação e polimerização.

Esta concepção faz com que as três etapas de PCR ocorram sequencial e repetidamente, atingindo assim amplificação de sequências de ácido nucleico de ADN pelo processo de PCR. Exemplifica-se infra uma operação mais detalhada.

Por exemplo, a região 1 de temperatura elevada localizada na parte do fundo da amostra pode ser mantida a uma temperatura entre 90 e 94°C, temperatura à qual os ADN em cadeia dupla podem ser separados em ADN em cadeia simples. Tal arranjo faz com que a etapa de desnaturação ocorra principalmente na região 1. A região 2 de temperatura baixa localizada na parte do topo da amostra pode ser mantida à

temperatura de hibridação entre 35 e 65°C de modo que os ADN desnaturados na região de temperatura elevada na parte do fundo se movam para a região de temperatura baixa na parte do topo por convecção térmica e consequentemente os ADN em cadeia simples possam hibridar com os iniciadores que são complementares ao ADN em cadeia simples, formando complexos ADN-iniciador. Neste arranjo, caso se utilize para polimerização ADN-polimerase *Taq*, sabendo-se que a sua actividade óptima é a 72°C e que apresenta uma vasta gama de temperatura de actividade mesmo a baixa temperatura, a etapa de polimerização, em que a ADN-polimerase liga o complexo ADN-iniciador e o iniciador sofre extensão, pode ocorrer na região 2 de temperatura baixa e na região 5 de convecção da parte de topo. Assim, a etapa de desnaturação ocorre primeiramente na região 1 de temperatura elevada e os ADN desnaturados movem-se para a região 2 de baixa temperatura por convecção térmica. A etapa de hibridação ocorre assim na região de temperatura baixa na presença dos iniciadores. A etapa de polimerização ocorre finalmente na presença de ADN-polimerase durante o período de tempo em que os complexos ADN-iniciador formados na etapa de hibridação passam através da região 2 de temperatura baixa e a região 5 de convecção por convecção térmica. Consequentemente, as etapas de desnaturação, hibridação e polimerização podem ocorrer sequencial e repetidamente, amplificando assim eficazmente as sequências alvo da amostra de ADN.

Noutras concretizações, tal como apresentadas na figura 2, considera-se que três regiões específicas do vaso reaccional estão em contacto térmico com várias fontes de calor. A figura 2a apresenta um diagrama esquemático ilustrativo de uma concretização em que várias fontes de calor 3, 3' e 4 estão dispostas para formar duas regiões de temperatura elevada 1 e 1' e uma região de temperatura baixa 2. A figura 2b apresenta um diagrama esquemático ilustrativo de outra concretização na qual várias fontes de calor 3, 4 e 4' estão dispostas para formar uma região 1 de temperatura elevada e duas regiões 2 e 2' de temperatura baixa. As várias fontes de calor aqui utilizadas podem ser dispostas separadamente para cada região de temperatura ou pode utilizar-se a mesma fonte de calor para mais do que uma região de temperatura. Na concretização ilustrada na figura 2a, se as duas regiões 1 e 1' de

temperatura elevada forem concebidas para as etapas de desnaturação e polimerização, respectivamente, cada região deve ser posta em contacto com uma fonte de calor que possa manter a temperatura dessa região adequada para cada etapa. Na concretização ilustrada na figura 2b, se ambas as regiões 2 e 2' de temperatura baixa forem concebidas para a etapa de hibridação é preferível utilizar uma fonte de calor em substituição das duas fontes de calor 4 e 4'. Além disso, a figura 2b mostra que é possível, de acordo com o presente invento, construir um vaso reaccional com entrada e saída da amostra separadas.

De modo a aumentar a eficácia do presente invento, é importante controlar a velocidade da convecção térmica de modo que a reacção em cada etapa possa ocorrer suficientemente e ao mesmo tempo se possa reduzir o tempo de reacção total. Tal pode ser efectuado através de (a) controlo do gradiente de temperatura entre as regiões de temperatura específica, (b) controlo do diâmetro do vaso reaccional ou (c) alteração do material do vaso reaccional. Quando se controla o gradiente de temperatura para ajustar a velocidade de convecção térmica é mais conveniente variar a diferença de temperatura entre as regiões de temperatura específica.

No entanto, tal apresenta uma limitação dado que cada uma das regiões de temperatura específica tem a sua própria função para PCR que é dependente da temperatura. Assim, a distância entre a região de temperatura elevada (1 e 1') e a região de temperatura baixa (2 e 2') pode ser variada para obter o mesmo efeito. Por exemplo, o gradiente de temperatura torna-se menor à medida que aumenta a distância entre as duas regiões de temperatura, se a diferença de temperatura permanecer a mesma e assim a velocidade de convecção térmica diminui. Dado que a força de adesão entre a parede do vaso reaccional e a amostra é um factor que inibe a convecção térmica, a velocidade de convecção térmica pode ser controlada por ajuste do diâmetro do vaso reaccional. À medida que a razão da área superficial do vaso reaccional em contacto com a amostra relativamente ao volume da amostra aumenta, a força de adesão aumenta e a velocidade de convecção térmica diminui. Assim, a velocidade de convecção térmica pode ser controlada por ajuste do diâmetro do vaso reaccional, controlando assim a área

superficial do vaso reaccional em contacto com a amostra. A força de adesão entre a amostra e a parede do vaso reaccional tem também uma relação estreita com o material do vaso reaccional. Dado que o processo de PCR é normalmente efectuado numa solução aquosa, os materiais hidrófobos tais como polietileno e polipropileno que apresentam menor força de adesão à água levam a velocidades de convecção superiores comparativamente a materiais hidrófilos tais como vidro. Assim, a eficácia do presente invento pode ser melhorada adicionalmente por concepção do vaso reaccional adequado para a cinética da reacção de PCR com base nos princípios descritos supra.

A figura 3 apresenta uma vista de secção transversal (figura 3a) e uma vista em perspectiva (figura 3b) do aparelho de amplificação de sequências de ácido nucleico de acordo com uma concretização do presente invento. O aparelho apresentado na figura 3 inclui várias fontes de calor como meio de manter a temperatura, que incluem uma unidade de aquecimento; uma unidade de arrefecimento; ou uma combinação de uma unidade de aquecimento e uma unidade de arrefecimento. De preferência, pode incluir-se meios de isolamento entre as fontes de calor para isolar termicamente as fontes de calor. Nesta concretização particular, o aparelho inclui uma primeira e uma segunda fonte de calor que estão em contacto térmico com regiões específicas da amostra. A primeira fonte de calor consiste de um primeiro bloco de condução térmica 101 e uma unidade de aquecimento eléctrica 104 que fornece calor ao primeiro bloco de condução térmica. O primeiro bloco de condução térmica está em contacto térmico com a parte de fundo do vaso reaccional para formar uma região de temperatura elevada na parte do fundo da amostra. A segunda fonte de calor é um segundo bloco de condução térmica 102 e um banho de circulação de água que circula água a uma determinada temperatura através do interior do segundo bloco de condução térmica para manter a temperatura do segundo bloco de condução térmica a uma temperatura adequada. O segundo bloco de condução térmica 102 está em contacto térmico com a parte de topo do vaso reaccional para formar uma região de temperatura baixa na parte de topo da amostra. O segundo bloco de condução térmica 102 inclui uma entrada 105 através da qual flui água proveniente do banho de água, uma saída 106 através do qual

sai a água e um canal de circulação de fluido para circular a água dentro do segundo bloco de condução térmica. Embora não esteja representado na figura 3 o canal de circulação de fluido no segundo bloco de condução térmica, o perito na arte pode entender que o canal de circulação de fluido está concebido para transferir calor uniformemente para o segundo bloco de condução térmica 102. O material dos blocos de condução térmica 101 e 102 é seleccionado para ser cobre, que tem uma condutividade térmica elevada e insere-se um isolante 107 entre os dois blocos para impedir transferência de calor directa. Os primeiro e segundo blocos de condução térmica 101 e 102 têm aberturas de recepção para a introdução dos vasos reaccionais. A abertura de recepção consiste de uma abertura 111 com uma das extremidades fechada no primeiro bloco de condução térmica 101, um orifício de passagem 112 no segundo bloco de condução térmica e outro orifício de passagem 117 no isolante.

Nos exemplos 1, 2 e 3 descritos infra, a região de temperatura elevada na parte do fundo da amostra é mantida a 94°C por controlo da unidade de aquecimento eléctrica 104 e a região de temperatura baixa de uma parte de topo da amostra a 45°C por controlo da temperatura da água no banho de circulação de água.

O presente invento não se limita ao aparelho de amplificação de sequências de ácido nucleico representado na figura 3. São possíveis as seguintes modificações.

Em primeiro lugar, as estruturas dos blocos de condução térmica 101 e 102 podem ser modificadas. Por exemplo, o primeiro bloco de condução térmica 101 pode ser posto em contacto térmico com a parte do fundo do vaso reaccional e o segundo bloco de condução térmica 102 com a parte de topo do vaso reaccional, enquanto que a parte intermédia do vaso reaccional pode ser posta em contacto com ar ou com um terceiro bloco de condução térmica. Além disso, de modo diferente da concretização representada na figura 3 na qual o calor é transferido dos blocos para as regiões específicas da amostra através da parede do vaso reaccional, os blocos de condução térmica podem ser postos em contacto directo com a amostra.

Em segundo lugar, o material dos blocos de condução térmica pode ser modificado. Na concretização representada na figura 3, utilizam-se os blocos de condução térmica 101 e 102 feitos de cobre, mas o material não está limitado ao cobre. Pode ser utilizado praticamente qualquer material que possa transferir calor para o vaso reaccional. Por exemplo, pode ser utilizado outro sólido ou fluido, tal como líquido ou gás, condutor térmico em substituição dos blocos de condução térmica utilizados supra. Para alguns casos, pode utilizar-se radiação de infravermelhos ou outros meios para substituir alguns ou todos os blocos de condução térmica 101 e 102.

Em terceiro lugar, os meios para manter as temperaturas dos primeiro e segundo blocos de condução térmica não se limitam a um banho de circulação de água ou uma unidade de aquecimento eléctrico. Pode ser utilizada praticamente qualquer unidade que possa fornecer calor ou remover calor da amostra.

Em quarto lugar, pode ser utilizado praticamente qualquer meio tal como sólido, líquido ou gás em substituição do isolante 107 representado na figura 3 desde que seja adequado para isolar a transferência de calor entre materiais condutores. É também possível utilizar uma composição que não inclua um isolante.

Finalmente, quando se utiliza um vaso reaccional modificado (por exemplo, os apresentados nas figuras 2a ou 2b) em vez do vaso reaccional representado na figura 1 para facilitar a convecção térmica, podem utilizar-se várias fontes de calor incluindo blocos de condução térmica e suas modificações que são modificados adequadamente com base no princípio do presente invento.

O primeiro, segundo e terceiros casos descritos supra são exemplos nos quais se modifica uma parte da fonte de calor, particularmente o bloco de condução térmica. Tal como aqui utilizado, a fonte de calor refere-se a qualquer meio que possa ser utilizado para manter a temperatura da amostra a um valor específico. Assim, além dos exemplos de modificação das fontes de calor descritas supra, pode ser utilizado qualquer dispositivo como fonte de calor no presente invento desde que

possa ser utilizado para manter uma região específica da amostra a uma temperatura seleccionada. O presente invento inclui praticamente qualquer aparelho que tenha como função manter regiões específicas da amostra a temperaturas seleccionadas. Tal é devido ao facto do presente invento ser caracterizado não por uma concepção particular das fontes de calor mas pelo arranjo especial das fontes de calor concebido para gerar uma distribuição de temperaturas específica dentro da amostra, que permita que o processo de PCR ocorra sequencial e repetidamente.

Podem variar-se concepções mais detalhadas dos exemplos de modificação descritos supra dependendo do desenvolvimento de tecnologias industriais. Assim, omitem-se explicações detalhadas.

A figura 4 apresenta uma distribuição de temperaturas medida a várias alturas a partir do fundo do vaso reaccional, demonstrando o princípio do processo de PCR baseado na convecção térmica. A convecção térmica é um fenómeno pelo qual se induz movimento de fluido por uma diferença de densidade gerada pela diferença de temperatura. Este tipo de convecção denomina-se convecção natural, que se distingue de uma convecção forçada em que o fluido é forçado a movimentar-se através de uma bomba ou de um propulsor. A expressão convecção, tal como utilizada no presente invento, refere-se sempre a convecção natural. Para ocorrer uma convecção natural no vaso reaccional, uma parte do fundo da amostra no vaso reaccional deve estar a uma temperatura mais elevada do que uma parte do topo.

Tal como pode ser verificado na figura 4, quando o primeiro bloco de condução térmica 101 em contacto com uma parte do fundo do vaso reaccional é mantida a 96°C e o segundo bloco de condução térmica 102 em contacto com uma parte de topo a 45°C, formam-se a região de temperatura mais alta (a região com a temperatura maior ou igual a 90°C na figura 4), a região de temperatura baixa (a região com a temperatura de cerca de 50°C) e a região de convecção (a região que apresenta um gradiente de temperatura). A amostra é sujeita à etapa de desnaturação na região de temperatura elevada. A amostra desnaturada move-se então para a região de temperatura baixa

através da região de convecção, na qual a amostra é sujeita à etapa de hibridação. Enquanto permanece na região de temperatura baixa e no movimento de volta através da região de convecção da região de temperatura baixa, a amostra é sujeita à etapa de polimerização. A convecção térmica causa a circulação da amostra entre as três regiões sequencial e repetidamente, levando assim a amplificação de sequências de ácido nucleico por PCR.

A figura 7 apresenta os resultados obtidos por utilização da ADN-polimerase imobilizada na superfície sólida. A expressão "ADN-polimerase imobilizada" tal como aqui utilizada significa uma ADN-polimerase que se encontra imobilizada num suporte sólido com a sua actividade de polimerase conservada. Podem ser utilizados vários métodos para preparar a ADN-polimerase imobilizada, mas o método deve proporcionar uma ADN-polimerase imobilizada com uma actividade de polimerase suficientemente elevada para permitir detecção de sequências de ácido nucleico amplificadas por PCR dos ADN molde. A ADN-polimerase imobilizada utilizada nos exemplos do presente invento foi preparada de modo a preservar uma actividade de polimerase elevada por utilização de um método no qual o local activo da ADN-polimerase foi mascarado por um substrato de ADN e imobilizada numa superfície de Au por ligação covalente. Descreve-se no exemplo o procedimento detalhado do método de imobilização. A actividade de polimerase da enzima imobilizada tal como preparada por este método foi suficientemente elevada (cerca de 60-80% comparativamente a ADN-polimerase em fase de solução) para utilização em PCR. No entanto, a ADN-polimerase imobilizada que pode ser utilizada com o presente invento não se limita às preparadas pelo método utilizado no exemplo do presente invento, mas inclui as preparadas por outros métodos.

No método de amplificação de sequências de ácido nucleico do tipo de convecção térmica de acordo com o presente invento, podem ser utilizadas ADN-polimerases que não são termoestáveis, tal como fragmento de *Klenow* e ADN-polimerase de T7, além das polimerases termoestáveis, tais como ADN-polimerase *Taq*. Tal é devido ao seguinte facto. Dadas as características do presente invento, a temperatura da amostra total não muda de uma temperatura elevada para uma temperatura baixa ou vice-versa repetidamente, mas mantêm-se regiões

específicas na amostra a temperaturas constantes. Por exemplo, a parte de topo da amostra pode ser mantida a uma temperatura baixa, enquanto que a parte do fundo da amostra pode ser mantida a uma temperatura elevada. É possível utilizar ADN-polimerase que não é termoestável, por localização da ADN-polimerase imobilizada na região de temperatura baixa ou na parte de topo da região de convecção perto da região de temperatura baixa.

Os exemplos 1, 2 e 3 descritos infra confirmam que os objectivos do presente invento podem ser atingidos utilizando um aparelho de amplificação de sequências de ácido nucleico do presente invento.

Exemplo 1.

1. Métodos

1.1. Vaso reaccional

Utilizou-se um tubo de vidro com uma extremidade fechada como vaso reaccional. O tubo de vidro tinha um comprimento de 55-60 mm, um diâmetro interno de 2 mm, um diâmetro externo de 8 mm e uma espessura de 3 mm na extremidade fechada do lado do fundo do tubo. A parede interna do tubo de vidro foi revestida com politetrafluoroetileno utilizando um material de revestimento do tipo aerossol e foi endurecido termicamente.

1.2. Amostra

Utilizou-se amostra de pBluescript II KS (+) como um ADN molde. A amostra utilizada em PCR continha 40 ng do ADN molde, 40 pmol de cada iniciador T3 (5'-ATTAACCCTCACTAAAG-3') (SEQ ID NO:1) e iniciador T7 (5'-AATACGACTCACTATAG-3') (SEQ ID NO:2), 4 nmol de dNTP, 1 pmol (5 U) de ADN-polimerase *Taq*, 250 nmol de $MgCl_2$ em 100 μl de tampão Tris 10 mM a pH 8,3 contendo KCl 50 mM.

1.3. Temperatura de reacção e tempo de reacção

Em primeiro lugar, o primeiro bloco de condução térmica 101 foi aquecido com uma unidade de aquecimento eléctrica e mantido a 96°C e o segundo bloco de condução térmica 102 foi mantido a 45°C utilizando um banho de circulação de água. A amostra preparada supra foi injectada no vaso reaccional e inseriu-se então o vaso reaccional no

receptor 111, 117 e 112. Deixou-se a amostra reagir durante um período de tempo adequado. Durante a reacção, o vaso reaccional foi pressurizado a cerca de 1,2 atm por adição de azoto gasoso para evitar que a solução da amostra entrasse em ebulição.

1.4. Medição da distribuição de temperaturas na amostra

A temperatura em cada região da amostra foi medida nas condições reaccionais supra. Colocou-se a ponta de um termómetro de termopar de 2,5 mm em 2,5 mm a partir do fundo do vaso reaccional e mediu-se e registou-se a temperatura após um tempo suficiente. Apresenta-se na figura 4 um exemplo da distribuição de temperaturas da amostra no vaso reaccional.

2. Resultados

Primeiro, a temperatura medida em cada região da amostra no vaso reaccional nas condições reaccionais supra confirmou (consultar figura 4) que se formam uma região de alta temperatura superior a 90°C para desnaturação, uma região de temperatura baixa a cerca de 50°C para hibridação e uma região de convecção com um gradiente de temperatura para indução da convecção térmica. Espera-se que a polimerização ocorra na região de temperatura baixa e na parte mais elevada da região de convecção.

Após incubar a amostra durante um determinado tempo de reacção nas condições reaccionais supra, retirou-se o vaso reaccional e arrefeceu-se. Analisaram-se os produtos de reacção por electroforese utilizando gel de agarose a 1,0%. A figura 5 é uma fotografia dos resultados de electroforese obtidos em tempos de reacção até quatro horas em intervalos de tempo de 30 min. O produto da reacção é um ADN em cadeia dupla de 164 pb. Tal como pode ser verificado na figura 5, a reacção de PCR atinge saturação antes de 90 min.

Exemplo 2.

1. Métodos

Além do par de iniciadores T3/T7, analisaram-se também nas experiências os pares iniciadores KS/U, KS/*Pvu* II e KS/*Nae* I. O tempo de reacção foi de 150 min e as outras condições reaccionais foram as mesmas do exemplo 1. As sequências dos

iniciadores T3 e T7 foram descritas no exemplo 1 e as sequências dos outros iniciadores são as seguidamente apresentadas:

Iniciador KS: 5'-CGAGGTCGACGGTATCG-3' (SEQ ID NO:3)
Iniciador U: 5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3' (SEQ ID NO:4)
Iniciador *Pvu* II: 5'-TGGCGAAAGGGGGATGT-3' (SEQ ID NO:5)
Iniciador *Nae* I: 5'-GGCGAACGTGGCGAGAA-3' (SEQ ID NO:6)

2. Resultados

Tal como no exemplo 1, os produtos da reacção foram analisados por electroforese. A figura 6 é uma fotografia dos resultados de electroforese do exemplo 2, em que as pistas 1, 2, 3 e 4 são os resultados obtidos com os pares de iniciadores T3/T7, KS/U, KS/*Pvu* II e KS/*Nae* I, respectivamente. Pode verificar-se que os quatro pares iniciadores produziram ADN em cadeia dupla com os tamanhos correctos de 164 pb, 144 pb, 213 pb e 413 pb, respectivamente.

Exemplo 3.

1. Métodos

Em vez de adicionar ADN-polimerase *Taq* à amostra, imobilizou-se ADN-polimerase *Taq* na superfície de um fio de Au e colocou-se na região de temperatura baixa. As outras condições experimentais foram as mesmas do exemplo 1.

O método utilizado para imobilizar a ADN-polimerase descreve-se infra.

Misturaram-se o ADN em cadeia simples de 65 bases e o iniciador KS apresentado infra num tampão de fosfato pH 8,3 a uma razão molar 1:1. Incubou-se a solução resultante a 94°C durante 10 min e seguidamente arrefeceu-se lentamente abaixo de 35°C. Durante este processo, hibridaram-se o ADN em cadeia simples de 65 bases e o iniciador KS para formar um ADN parcialmente em cadeia dupla. Adicionou-se a esta solução um número de moles apropriado de ADN-polimerase *Taq* (AmpliTaq Gold) adquirido a Perkin Elmer (E.U.A.) e incubou-se a mistura resultante num banho seco a 72°C durante 10 min. Seguidamente, a mistura foi mudada para um banho seco a 50°C e incubada durante 20 min para finalizar a preparação de uma ADN-

polimerase mascarada na qual o ADN parcialmente em cadeia dupla está ligado ao local activo da ADN-polimerase.

Iniciador KS: 5'-CGAGGTCGACGGTATCG-3' (SEQ ID NO:1)

65-mero: 3'-CCAGCTGCCATAGCTATTTTCTTTTCTTTCTTAAGTTCTTTTCTTTTCCT AGGTGATCAAGATCT-5' (SEQ ID NO:7)

De modo a ter uma quantidade máxima de ADN-polimerase imobilizada de 0,26 pmol, preparou-se um fio de Au com um diâmetro externo de 0,1 mm e um comprimento de 4,7 cm e utilizou-se após manipulá-lo para a forma de uma hélice com um diâmetro externo de 1,5 mm e um comprimento de cerca de 4 mm. De modo a assegurar a limpeza da superfície do fio de Au, lavou-se com solução Piranha durante 10-15 minutos a 60-70°C e enxaguou-se com água desionizada e subsequentemente com etanol absoluto, imediatamente antes de utilização.

De modo a introduzir grupos reaccionais para imobilização na superfície de Au, formou-se uma monocamada de moléculas de tiol na superfície do Au por utilização da reacção de formação da ligação Au-S, ou seja, por utilização da reacção de formação de tiolato entre uma molécula ligante com um grupo tiol e Au, para preparar um material de suporte. Nesta reacção, utilizou-se uma solução de mistura contendo dois tipos de moléculas de tiol com um grupo de reacção de imobilização e um grupo não reactivo, respectivamente. A fracção molar da molécula de tiol com o grupo de reacção de imobilização relativamente às moles totais das duas moléculas de tiol foi seleccionada como 5%. De modo a introduzir um grupo de reacção de imobilização carboxilo, utilizou-se ácido 12-mercaptododecanóico com uma cadeia alquilo relativamente longa como molécula ligante. Como molécula de tiol com um grupo não reactivo utilizou-se 6-mercapto-1-hexanol ou 1-heptanotiol como uma molécula de matriz. Introduziu-se o grupo de reacção de imobilização carboxilo na superfície do fio de Au colocando-o em 100 μl de uma solução mista 2 mM em etanol durante 2 horas à temperatura ambiente e lavando-o com etanol absoluto.

O fio de Au no qual foram introduzidos os grupos de reacção de imobilização carboxilo foi colocado em 120 μl de uma solução de etanol contendo 1-etil-3-(3-

dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) 10 mM e N-hidroxissuccinimida (NHS) 5 mM durante 2 horas à temperatura ambiente. O grupo carboxilo foi activado por reacção com NHS na presença de EDC e formando assim NHS-éster.

Após activação dos grupos carboxilo da monocamada de tiol, colocou-se o fio de Au na solução de enzima contendo a ADN-polimerase com o local activo mascarado. Nesta etapa, o carboxilo activado (NHS-éster) da monocamada de tiol reagiu com a amina primária da proteína, formando uma ligação amida (-CO-NH-). Consequentemente, a ADN-polimerase *Taq* foi imobilizada no material de suporte.

2. Resultados

Tal como no exemplo 1, os produtos de reacção foram analisados por electroforese. A figura 7 é uma fotografia dos resultados de electroforese obtidos em tempos de reacção até 4 horas com intervalos de 30 min. Tal como se pode verificar na figura 7, a reacção de PCR atinge saturação antes de 150 minutos.

A partir dos resultados do exemplo 1, 2 e 3 podem verificar-se os seguintes pontos.

Primeiramente, o aparelho de amplificação de sequências de ácido nucleico baseado na convecção térmica de acordo com o presente invento funciona eficazmente.

Em segundo lugar, confirmou-se que o processo de PCR pode ser efectuado por localização da ADN-polimerase imobilizada numa superfície sólida na região de temperatura baixa ou na parte de topo da região de convecção por utilização do aparelho de amplificação de sequências de ácido nucleico baseado na convecção térmica de acordo com o presente invento. Foi assim confirmado que também podem ser utilizadas ADN-polimerases que não são estáveis a temperatura elevada.

Deve ser aparente aos peritos na arte que o presente invento descrito supra não se limita às concretizações supra e aos esquemas anexos.

Consequentemente, as concretizações e modificações supra apresentam-se apenas a título ilustrativo e não devem ser interpretadas como limitativas do presente invento. O verdadeiro âmbito do presente invento deve ser determinado pelas reivindicações seguintes e não se restringem de modo algum pela especificação.

Tal como descrito supra, no presente invento, mantêm-se várias regiões específicas da amostra a temperaturas específicas e a convecção térmica entre as regiões específicas provoca circulação da amostra dentro do vaso reaccional. Assim, as etapas de desnaturação, hibridação e polimerização podem ser efectuadas sequencial e repetidamente. Consequentemente, podem verificar-se os seguintes efeitos.

Em primeiro lugar, o aparelho de amplificação de sequências de ácido nucleico pode ser concebido com uma composição simples. O presente invento não necessita do processo para alterar a temperatura da amostra. Assim, a concepção segundo o presente invento pode ser efectuada mais simples porque não são necessários dispositivos complexos incluídos nos aparelhos anteriores para alterar e controlar a temperatura da amostra.

Em segundo lugar, os aparelhos de acordo com o presente invento podem ser facilmente miniaturizados ou integrados em aparelhos complexos tais como “Lab-on-a-chip” para efectuar o processo de amplificação de sequências de ácido nucleico por PCR. Podem também ser incorporados em aparelhos em que não é desejável alteração de temperatura.

Em terceiro lugar, podem também ser utilizadas ADN-polimerases que não são termoestáveis. Tal é devido a ser possível utilizar ADN-polimerases imobilizadas no presente invento por sua localização numa região específica dentro do vaso reaccional, em que a região é mantida a uma temperatura adequada para a actividade de polimerase. De acordo com o presente invento, quando se utiliza uma ADN-polimerase imobilizada, pode efectuar-se PCR com a ADN-polimerase imobilizada mantida à temperatura em que a polimerase é activa. Assim, de acordo com o presente invento, podem também ser utilizadas para o processo de PCR enzimas que têm as suas

actividades óptimas a baixa temperatura, tal como fragmento de Klenow ou ADN-polimerase de T7.

Finalmente, o tempo de reacção para PCR pode ser reduzido. No presente invento, não há necessidade de alterar a temperatura da amostra total. Assim, o tempo necessário para mudar e controlar a temperatura da amostra completa pode ser poupado.

Listagem de Sequências (PARTE DA DESCRIÇÃO)

<110> AHRAM BIOSYSTEMS INC.
HYUN JIN HWANG,
JEONG HEE KIM,
KYUNGHOON JEONG,

<120> MÉTODO E DISPOSITIVO PARA AMPLIFICAÇÃO DE SEQUÊNCIAS DE ÁCIDO NUCLEICO UTILIZANDO CONVECÇÃO TÉRMICA

<130> apa21_kr_pct

<150> KR-10-2001-0057040
<151> 2001-09-15

<150> KR-10-2001-0066943
<151> 2001-10-30

<160> 7

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
<211> 17
<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>
<223> Sequência sintética

<400> 1
attaaccctc actaaag 17

<210> 2
<211> 17
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Sequência sintética

<400> 2
aatacgactc actatag 17

<210> 3
<211> 17
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Sequência sintética

<400> 3
cgaggtcgac ggtatcg 17

<210> 4
<211> 17
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Sequência sintética

<400> 4
gtaaaacgac ggccagt 17

<210> 5
<211> 17
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Sequência sintética

<400> 5
tggcgaaagg gggatgt 17

<210> 6
<211> 17
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Sequência sintética

<400> 6
ggcgaacgtg gcgagaa 17

<210> 7
<211> 65
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Sequência sintética

<400> 7

tctagaacta gtggatcctt ttctttttctt gaattctttc ttttctttta tcgataccgt 60

cgacc 65

Lisboa,

REIVINDICAÇÕES

1. Método de amplificação de sequências de ácido nucleico utilizando reacção em cadeia com polimerase (PCR), em que o método inclui:

uma etapa de injecção para um vaso reaccional de uma amostra contendo um ADN molde contendo sequências de ácido nucleico alvo a amplificar, ADN-polimerase, desoxiadenosina-trifosfato, desoxicitidina-trifosfato, desoxiguanosina-trifosfato, desoxitimidina-trifosfato e pelo menos dois oligonucleótidos iniciadores complementares ao terminal 3' de cada uma das sequências de ácido nucleico alvo; e

uma etapa de manutenção de uma distribuição de temperaturas espacial específica na amostra através do contacto térmico com a amostra de uma variedade de fontes de calor que proporcionam calor ou removem calor de várias regiões específicas da amostra, de modo que uma região com temperatura relativamente elevada se encontre localizada a uma altura mais baixa do que uma região de temperatura relativamente baixa,

em que a distribuição de temperaturas espacial específica inclui regiões espaciais específicas, cada uma cumprindo uma condição de temperatura adequada para (i) uma etapa de desnaturação na qual os ADN em cadeia dupla se separam em ADN em cadeia simples, (ii) uma etapa de hibridação na qual os ADN em cadeia simples formados na etapa de desnaturação hibridam com os iniciadores para formar complexos ADN-iniciador ou (iii) uma etapa de polimerização na qual os iniciadores no complexo ADN-iniciador são estendidos pela reacção de polimerização,

e em que a distribuição de temperaturas espacial específica é uma distribuição de temperaturas que induz circulação da amostra por convecção térmica de modo que as etapas de desnaturação, hibridação e polimerização ocorram sequencial e repetidamente no interior da amostra.

2. Método de amplificação de sequências de ácido nucleico de acordo com a reivindicação 1, em que pelo menos uma das fontes de calor inclui um sólido condutor térmico em contacto térmico com uma região específica do vaso reaccional ou com a amostra; e uma unidade de aquecimento que proporciona calor ao sólido condutor térmico, uma unidade de arrefecimento

que remove calor do sólido condutor térmico ou uma combinação da unidade de aquecimento e da unidade de arrefecimento.

3. Método de amplificação de sequências de ácido nucleico de acordo com a reivindicação 1, em que pelo menos uma das fontes de calor inclui um líquido em contacto térmico com uma região específica do vaso reaccional; um receptor no qual o líquido deve estar contido; e uma unidade de aquecimento que fornece calor ao líquido, uma unidade de arrefecimento que remove calor do líquido, ou uma combinação da unidade de aquecimento e da unidade de arrefecimento.

4. Método de amplificação de sequências de ácido nucleico de acordo com a reivindicação 3, em que pelo menos uma das fontes de calor inclui adicionalmente uma unidade de circulação que circula o líquido em torno do vaso reaccional.

5. Método de amplificação de sequências de ácido nucleico de acordo com a reivindicação 1, em que pelo menos uma das fontes de calor inclui um gás em contacto térmico com uma região específica do vaso reaccional; uma unidade de aquecimento que fornece calor ao gás, uma unidade de arrefecimento que remove calor do gás ou uma combinação da unidade de aquecimento e da unidade de arrefecimento; e uma unidade de circulação que circula o gás em torno do vaso reaccional.

6. Método de amplificação de sequências de ácido nucleico de acordo com a reivindicação 1, em que pelo menos uma das fontes de calor é uma unidade de geração de radiação de infravermelhos que fornece calor directamente à amostra.

7. Método de amplificação de sequências de ácido nucleico de acordo com a reivindicação 1, em que o método utiliza uma forma de isolar a transferência de calor entre as fontes de calor.

8. Aparelho de amplificação de sequências de ácido nucleico utilizando PCR, em que o aparelho inclui:

várias fontes de calor que podem fornecer calor a, ou remover calor de, várias regiões específicas numa amostra contida num vaso reaccional,

em que as fontes de calor se encontram dispostas de modo a manter uma distribuição de temperaturas espacial específica na amostra, de modo que uma região com temperatura relativamente elevada se localize a uma altura mais baixa do que uma região de temperatura relativamente baixa,

em que a distribuição de temperaturas espacial específica inclui regiões espaciais específicas, cada qual cumprindo uma condição de temperatura adequada para (i) uma etapa de desnaturação em que os ADN em cadeia dupla se separam em ADN em cadeia simples, (ii) uma etapa de hibridação em que os ADN em cadeia simples formados na etapa de desnaturação hibridam com os iniciadores para formar complexos ADN-iniciador ou (iii) uma etapa de polimerização na qual os iniciadores nos complexos ADN-iniciador são estendidos pela reacção de polimerização,

e em que a distribuição de temperaturas espacial específica é uma distribuição de temperaturas que induz circulação da amostra por convecção térmica de modo que as etapas de desnaturação, hibridação e polimerização ocorram sequencial e repetidamente no interior da amostra.

9. Aparelho de amplificação de sequências de ácido nucleico de acordo com a reivindicação 8, em que pelo menos uma das fontes de calor inclui um sólido condutor térmico em contacto térmico com uma região específica do vaso reaccional ou com a amostra; e uma unidade de aquecimento que fornece calor ao sólido condutor térmico, uma unidade de arrefecimento que remove calor do sólido condutor térmico ou uma combinação da unidade de aquecimento e da unidade de arrefecimento.

10. Aparelho de amplificação de sequências de ácido nucleico de acordo com a reivindicação 8, em que pelo menos uma das fontes de calor inclui um líquido em contacto térmico com uma região específica do vaso reaccional; um receptor no qual o líquido deve estar contido; e uma unidade de aquecimento que fornece calor ao líquido, uma unidade de arrefecimento que remove calor do líquido, ou uma combinação da unidade de aquecimento e da unidade de arrefecimento.

11. Aparelho de amplificação de sequências de ácido nucleico de acordo com a reivindicação 10, em que pelo menos

uma das fontes de calor inclui adicionalmente uma unidade de circulação que circula o líquido em torno do vaso reaccional.

12. Aparelho de amplificação de sequências de ácido nucleico de acordo com a reivindicação 8, em que pelo menos uma das fontes de calor inclui um gás em contacto térmico com uma região específica do vaso reaccional; uma unidade de aquecimento que fornece calor ao gás, uma unidade de arrefecimento que remove calor do gás, ou uma combinação da unidade de aquecimento e da unidade de arrefecimento; e uma unidade de circulação que circula o gás em torno do vaso reaccional.

13. Aparelho de amplificação de sequências de ácido nucleico de acordo com a reivindicação 8, em que pelo menos uma das fontes de calor é uma unidade de geração de radiação de infravermelhos que fornece calor directamente à amostra.

14. Aparelho de amplificação de sequências de ácido nucleico de acordo com a reivindicação 8, em que o método utiliza um meio para isolar a transferência de calor entre as fontes de aquecimento.

15. Método de amplificação de sequências de ácido nucleico de acordo com a reivindicação 1, em que as várias fontes de calor incluem um primeiro sólido condutor térmico que está em contacto térmico com uma parte do fundo do vaso reaccional e um segundo sólido condutor térmico que está em contacto térmico com uma parte do topo do vaso reaccional.

16. Método de amplificação de sequências de ácido nucleico de acordo com a reivindicação 15, em que as várias fontes de calor incluem adicionalmente um terceiro sólido condutor térmico que está em contacto térmico com uma parte intermédia do vaso reaccional entre as partes do fundo e do topo.

17. Aparelho de amplificação de sequências de ácido nucleico de acordo com a reivindicação 8, em que as várias fontes de calor incluem um primeiro sólido condutor térmico que está em contacto térmico com uma parte do fundo do vaso

reaccional e um segundo sólido condutor térmico que está em contacto térmico com uma parte do topo do vaso reaccional.

18. Aparelho de amplificação de sequências de ácido nucleico de acordo com a reivindicação 17, em que as várias fontes de calor incluem adicionalmente um terceiro sólido condutor térmico que está em contacto térmico com uma parte intermédia do vaso reaccional entre as partes do fundo e do topo.

Lisboa,

Fig. 1

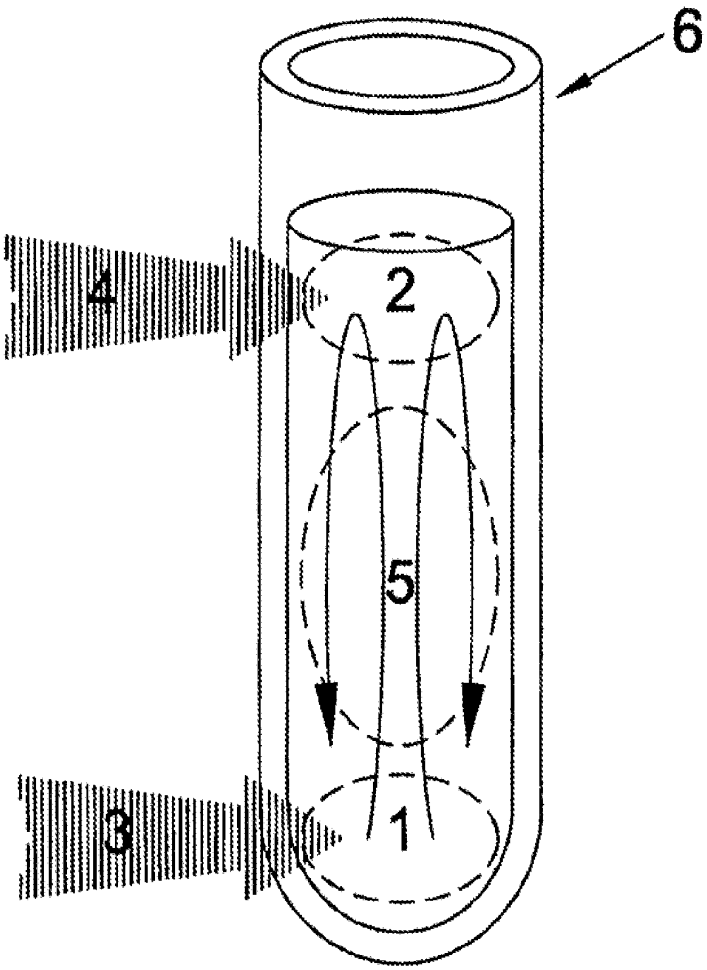


Fig. 2a

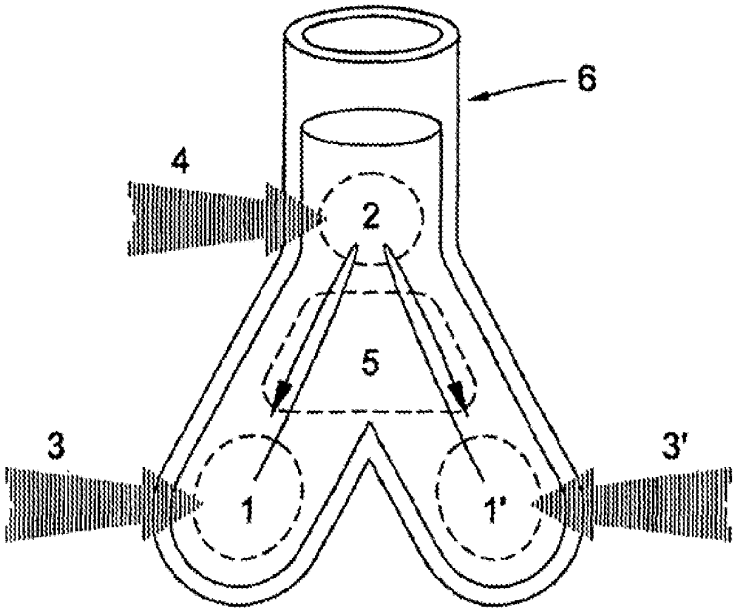


Fig. 2b

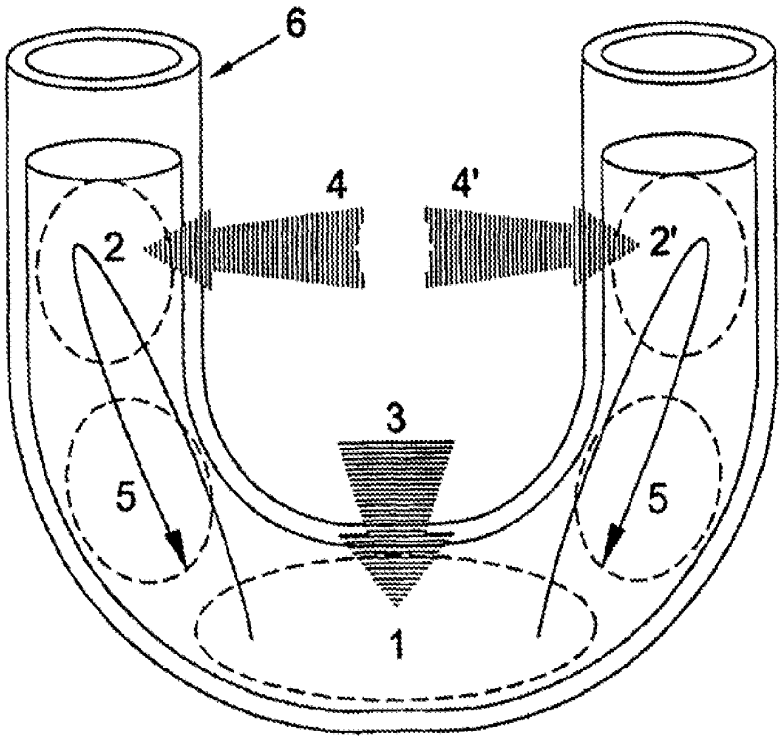


Fig. 3a

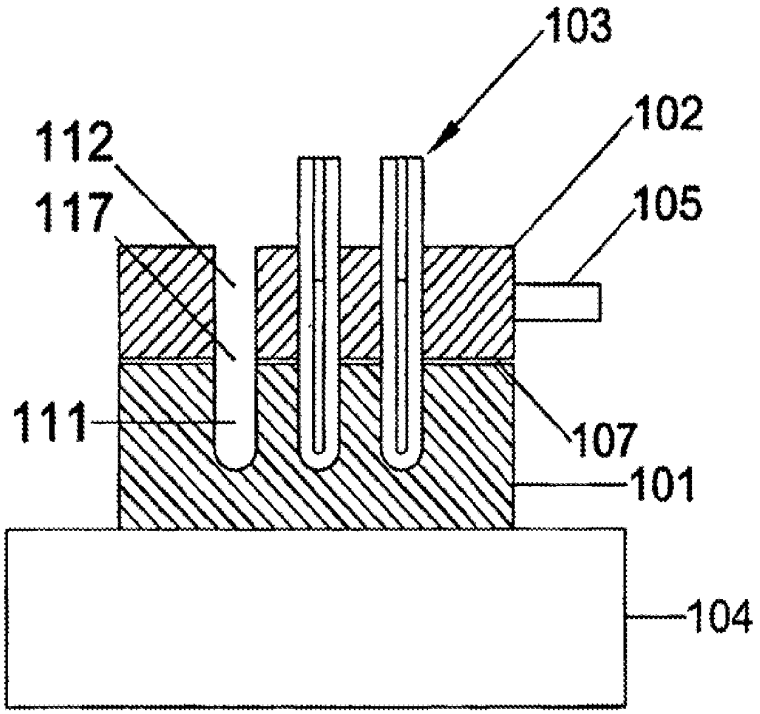


Fig. 3b

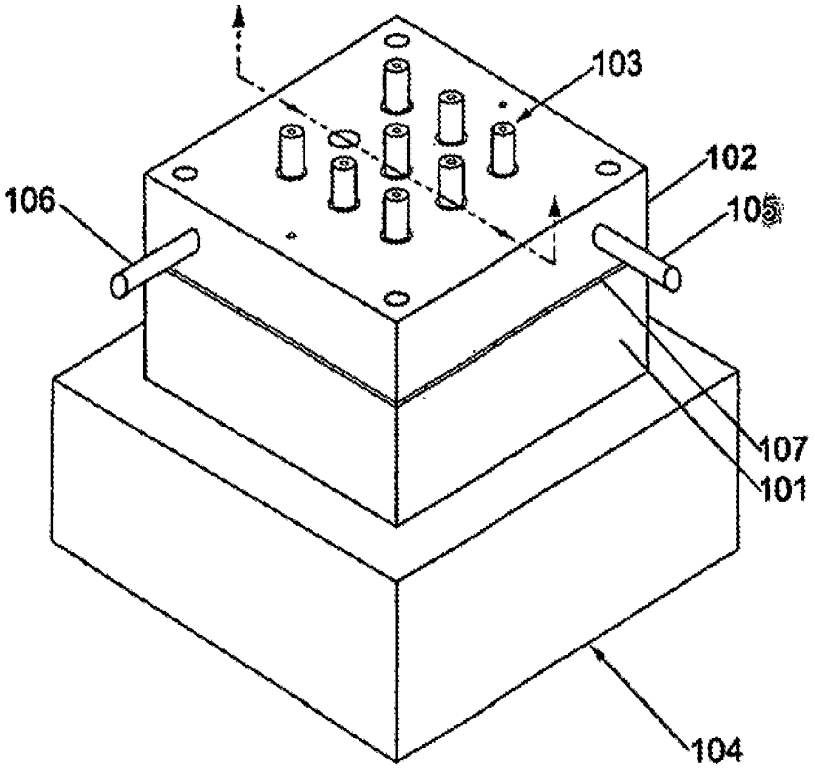

103
102
106
105
107
101
104

Fig. 4

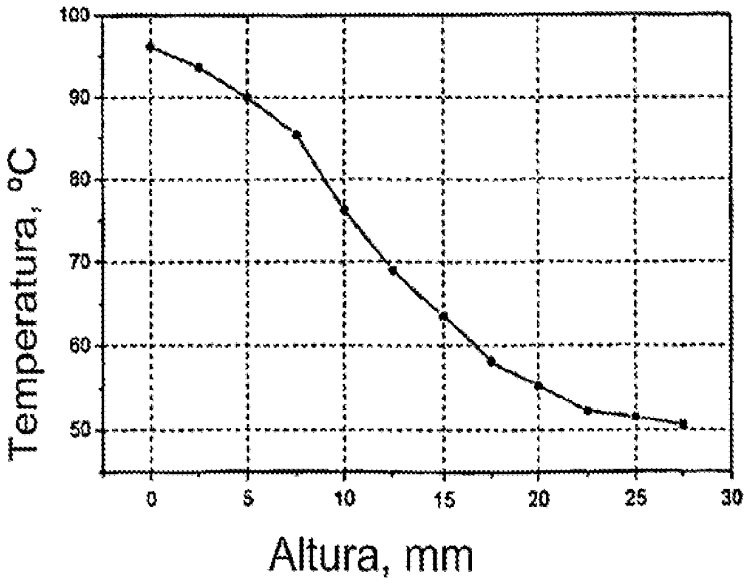

Temperatura, °C
100
90
80
70
60
50
0
5
10
15
20
25
30
Altura, mm

Fig. 5

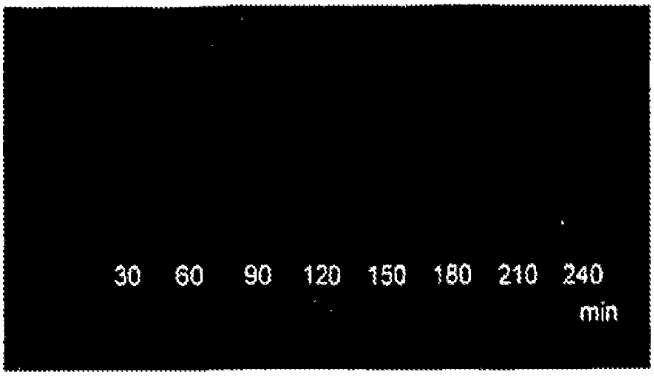


Fig. 6

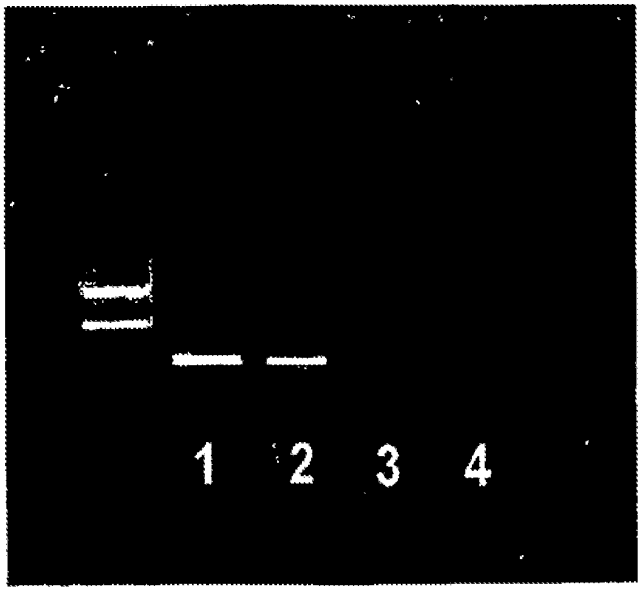


Fig.7

