

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

Zveřejněná podle §31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2016-837

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.:

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **28.12.2016**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **11.07.2018**
(Věstník č. 28/2018)

C12Q 1/68 (2018.01)
C12Q 1/6844 (2018.01)
C12Q 1/686 (2018.01)
B01L 99/00 (2010.01)

(71) Přihlašovatel:
Genomac výzkumný ústav, s.r.o., Praha, CZ

(72) Původce:
RNDr. Marek Minárik, Ph.D., Praha, CZ
Ing. František Foret, CSc., Praha, CZ
Bc. Barbora Belšánová, Praha, CZ
Jaromír Ladman, Praha, CZ

(54) Název přihlášky vynálezu:
**Zařízení pro amplifikaci DNA pomocí
polymerázové řetězové reakce v
miniaturním reaktoru**

(57) Anotace:
Zařízení, které umožňuje teplotní cyklování PCR reakční směsi pomocí termostatického elementu ponořeného do směsi, a kde je současně sníženo odpařování tím, že je reakční nádobka umístěna dnem vzhůru. Zařízení je vhodné pro provádění PCR amplifikace v miniaturních nádobkách, například ve vstupních portech mikrofluidních analyzátorů, kde je následně možno ihned provádět analýzu amplifikovaného produktu bez nutnosti pipetovacího mezikroku.

Název vynálezu:

Zařízení pro amplifikaci DNA pomocí polymerázové řetězové reakce v miniaturním reaktoru

Oblast techniky

Předpokládaný vynález se týká oblasti molekulární genetiky a diagnostiky využívající polymerázovou řetězovou reakci pro amplifikaci DNA fragmentů.

Dosavadní stav techniky

Metoda polymerázové řetězové reakce (PCR) je jednou ze základních technik využívaných v molekulární biologii, genetice a příbuzných oborech. PCR slouží k umělému namnožení (amplifikaci) určitého specifického úseku na základě procesu umělé in vitro replikace DNA pro potřeby dalšího zpracování či detekce. Základní princip je založen na opakované syntéze komplementárních řetězců jednořetězcových DNA fragmentů vzniklých denaturací dvojřetězcového produktu z předchozího kroku reakce. Při PCR reakci se tak cyklicky opakují kroky (i) denaturace, (ii) iniciace (nasednutí krátkých jednořetězcových DNA, tzv. primerů) a (iii) vlastní syntézy (prodloužení komplementárního řetězce). Pufrovaná směs reakčních komponent obsahující kromě předlohy pro kopírování (templátové DNA) především směs stavebních jednotek syntetizovaných fragmentů (G-, T-, A-, C- deoxyribonukleotidů) a enzym PCR polymerázu je v průběhu PCR reakce ohřívána na 3 různé teploty – například 95°C po dobu 30 sekund (denaturace), 54°C po dobu 30 sekund (nasednutí primerů) a 72°C po dobu 60 sekund (prodloužení řetězce) a tyto teploty jsou střídány postupně v průběhu typicky 20 až 25 cyklů¹.

Při nejrozšířenější konfiguraci probíhá PCR reakce v reakční nádobce, typicky v objemu od 5 µL do 20 µL, uvnitř PCR cykléru, ve kterém je tato nádobka umístěna v termostatickém bloku, který je zvenku ohříván a ochlazován. Rychlost přenosu tepla mezi blokem a reakční směsí a především prostupnost tepla stěnou reakční nádoby bývá často limitujícím faktorem pro zvýšení rychlosti PCR reakce. Po skončení amplifikace je produkt (amplifikovaný DNA fragment) z nádoby vyňat pro ověření správného průběhu reakce, případně další zpracování či detekci. Častým postupem je například vizualizace PCR amplifikátu nanesením části objemu reakčního produktu na agarozový gel s následnou elektroforetickou separací. V poslední době se namísto klasické gelové elektroforézy využívají dedikované přístroje, kde elektroforetická

separace probíhá ~~na~~ ve formátu mikrofluidního čipu, například systém Bioanalyzer 1200 od společnosti Agilent Technologies nebo Experion system od společnosti Bio-Rad Laboratories².

Podstata vynálezu

Ve zde navrhovaném řešení je namísto reakční nádoby ohříváné a ochlazované vnějším kontaktem s termostatovaným blokem použit termostatický element, který je do reakční nádoby ponořen a který převádí ohřev či ochlazování dovnitř reakční směsi z vnějšího teplotního cykléru, jak je ukázáno na Obrázku 1. Výhodou takového řešení je, že umožňuje teplotní cyklování uvnitř libovolných geometrických tvarů reakční nádoby, což lze například využít pro provádění PCR reakce v miniaturních nádobkách či vstupních portech mikrofluidních analyzátorů apod. V případě malých rozměrů reakční nádoby (v řádu do cca 20 μL) lze v rámci navrhovaného řešení současně umístit reakční nádobku dnem vzhůru (v důsledku povrchového napětí zůstává kapalina v nádobce) a tím snížit rychlost odpařování zahříváné směsi.

Příklady uskutečnění vynálezu

Jedním z příkladů využití navrhovaného zařízení je provádění PCR amplifikace přímo ve vstupním portu mikročipového analyzátoru Bioanalyzer 1200 společnosti Agilent Biotechnologies. Princip zařízení z Obrázku 1 byl adaptován tak, aby z jedné strany zařízení bylo možné vložit mikrofluidní čip používaný v systému Bioanalyzer (Obrázek 2). Současně bylo zařízení zdola opatřeno konickými sloupky z teplovodivého materiálu (měď), které se přesně zasunou do 96-jamkového bloku běžného PCR termocykléru, do kterého se zařízení vloží, jak je zobrazeno na Obrázku 2. PCR cyklér se následně nastaví na teplotní program a probíhající cyklování se pomocí navrhovaného zařízení přenáší pro amplifikaci přímo ve vstupním portu mikročipu. Po skončení programu tak lze čip obsahující amplifikovaný produkt ze zařízení vyjmout a rovnou vložit do mikročipového analyzátoru bez nutnosti dalšího pipetovacího mezikroku. Díky rozměrům bloku pro standardní 96-jamkové mikrotitrační destičky, lze navrhované zařízení použít pro amplifikaci ve 2 mikrofluidních čipech najednou.

¹ T.C. Lorenz, Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies, J. Vis. Exp. JoVE. (2012) e3998. doi:10.3791/3998.

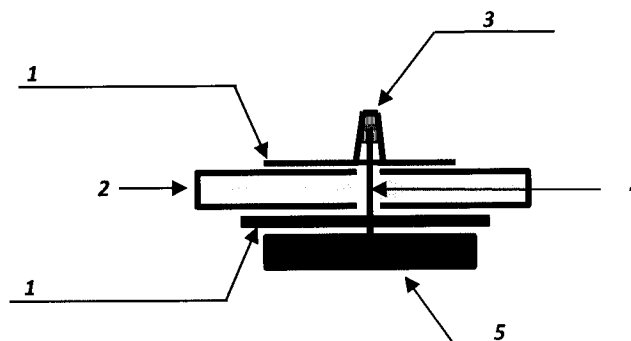
² Dolnik, V., Liu, S., Applications of capillary electrophoresis on microchip. J. Sep. Sci. 2005, 28, 1994–2009.

PATENTOVÉ NÁROKY

PV 2016 - P37

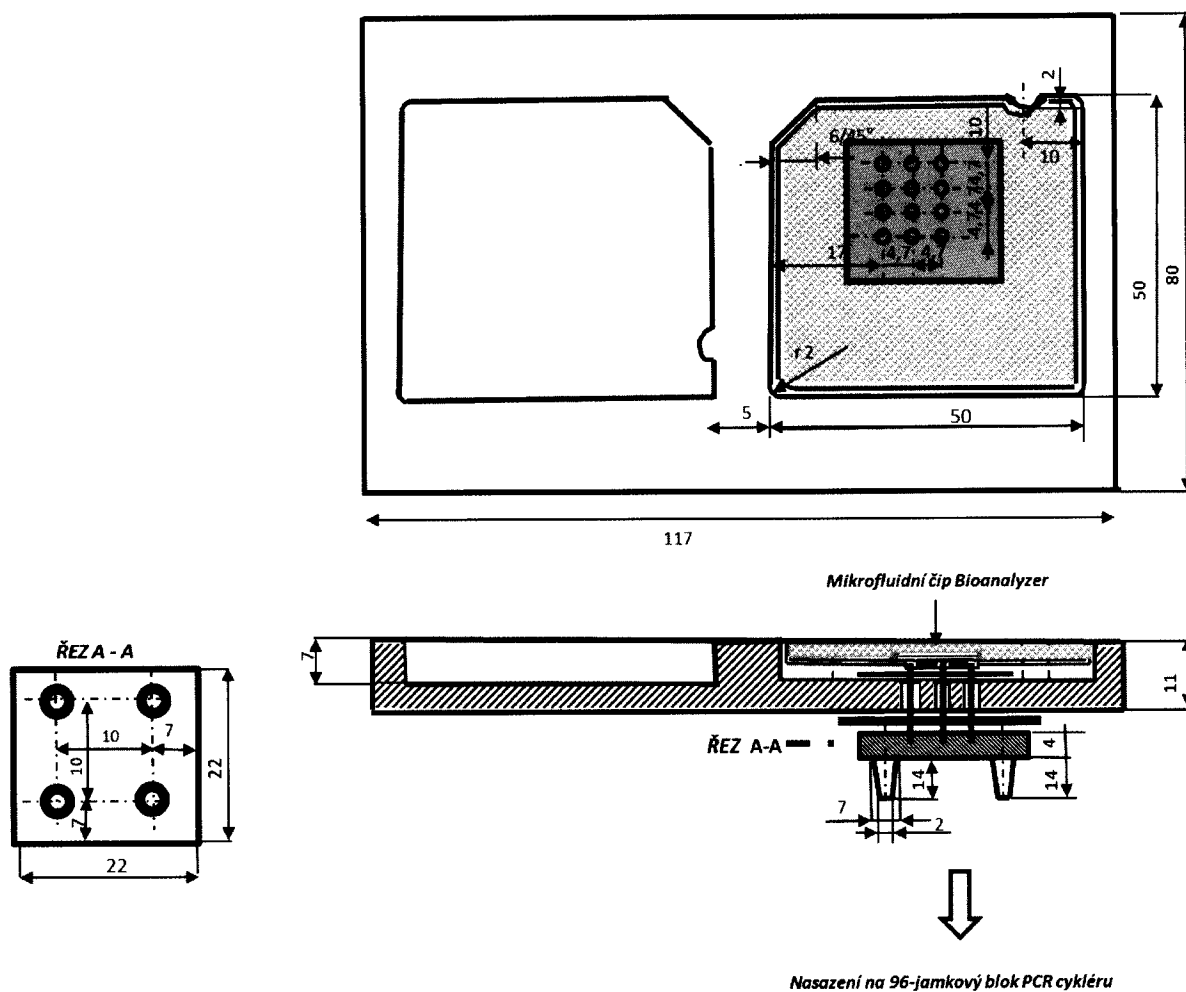
1. Systém pro amplifikaci nukleotidových sekvencí na bázi polymerázové řetězové reakce vyznačený tím, že do reakční nádoby je ponořen termostatický element, který zahřívá a ochlazuje reakční směs ve smyslu termocyklické amplifikační reakce.
2. Systém popsáný v bodě I. vyznačený tím, že reakční nádobkou je dávkovací kompartment mikrofluidního separačního zařízení.
3. Systém popsáný v bodě I. a II. vyznačený tím, že termostatický element je od přímého kontaktu s reakční směsí oddělen nepropustnou teplovodivou bariérou.
4. Systém popsáný v bodech I. až III. vyznačený tím, že reakční nádobka je otočena dnem vzhůru a termostatický element je do reakční směsi ponořen zdola tak, aby bylo potlačeno odpařování.
5. Systém popsáný v bodech I. až III. vyznačený tím, že termostatický element je použit jako míchadlo reakce.

Obrázek 1



Průřez zařízením umožňujícím PCR amplifikaci v miniaturní nádobce: 1 - silikonové těsnění, 2 - teplotní izolace, 3 - nádobka s PCR reakční směsí, 4 - termostatický element, 5 - ohřívavý/ochlazovaný blok

Obrázek 2



Zařízení adaptované pro provádění PCR amplifikace v miniaturní reakční nádobce – vstupního portu mikrofluidního čipu používaného v mikročipovém analyzátoru Bioanalyzer 2100. Zařízení umožňuje provádění amplifikace ve 2 čípech ~~ne~~ jednou (vyobrazeno použití s jedním vloženým čipem)