ÖZET

NÜKLEİK ASİT TETKİKİNDE KULLANILMAK İÇİN BİR CİHAZ

Bu buluş, nükleik asit varlığının tespit edilmesi istenen alanlarda kullanılmak üzere ilmiğe dayalı izotermal amplifikasyon (LAMP) teknolojisi ile nükleik asitlerin amplifikasyonu ve tayin edilmesi için, bir gövde (4) içinde en az bir amplifikasyon tüpü (17) yerleşecek şekilde bir numune seti (2) ve bir ısıtıcı (9) ihtiva eden bir DNA tetkik cihazını (20) konu alır.

İSTEMLER

1- Nükleik asit varlığının tespit edilmesi istenen alanlarda kullanılmak üzere ilmiğe dayalı izotermal amplifikasyon (LAMP) teknolojisi ile nükleik asitlerin amplifikasyonu ve tayin edilmesi için, bir gövde (4) içinde en az bir amplifikasyon tüpü (17) yerleşecek şekilde bir numune seti (2) ve bir ısıtıcı (9) ihtiva eden bir DNA tetkik cihazı (20) olup ayırt edici özelliği;

söz konusu gövdenin (4), numune seti (2) ile aynı hizada ve amplifikasyon tüpleri (17) gövde (4) dışından çıplak göz ile görünebilecek şekilde konumlanmış bir görüntüleme penceresi (5) ihtiva etmesi,

ve söz konusu DNA tetkik cihazının (20) bir PCB (10) üzerinde PID kontrol algoritması ile gövde (4) içindeki sıcaklığı ayarlayan bir mikroişlemci (11) ve bir dahili güç kaynağı (15) ihtiva etmesidir.

2- İstem 1'e bağlı bir DNA tetkik cihazı (20) olup özelliği; söz konusu görüntüleme penceresinin (5) cam malzemeden yapılmış olmasıdır.

3- İstem 1 veya 2'ye bağlı bir DNA tetkik cihazı (20) olup özelliği; söz konusu PCB (10) üzerinde gövde (4) içindeki sıcaklığı ölçmek için bir sıcaklık sensörü (14), bir sıcaklık sensörü dönüştürücüsü (12) ve bir güç yükselteci (13) ihtiva etmesidir.

4- İstem 3'e bağlı bir DNA tetkik cihazı (20) olup özelliği; söz konusu mikroişlemcinin (11) gövde (4) içindeki sıcaklık verisine dayanarak güç yükseltecinin (13) ısıtıcıya (9) akım göndermesini sağlayarak dahili güç kaynağı (15) aracılığıyla gövde (4) içindeki sıcaklığın değiştirilmesini veya sabit tutulmasını sağlayacak şekilde yapılanmış olmasıdır.

5- Yukarıdaki istemlerden herhangi birine bağlı bir DNA tetkik cihazı (20) olup özelliği; söz konusu amplifikasyon tüpü (17) içerisinde gerçekleşen LAMP tepkimesi süresince renk değişiminin takip edilebilmesi için boya maddesi olarak Hydroxy Naphthol Blue (HNB) bulunmasıdır.

6- Yukarıdaki istemlerden herhangi birine bağlı bir DNA tetkik cihazı (20) olup özelliği; söz konusu numune setinin (2) içine birer adet amplifikasyon tüpü (17) yerleşecek şekilde 4 adet tüp yuvası (3) ihtiva etmesidir.

TARİFNAME

NÜKLEİK ASİT TETKİKİNDE KULLANILMAK İÇİN BİR CİHAZ

Teknik Alan

Bu buluş, nükleik asit varlığının tespit edilmesi istenen alanlarda (örneğin sağlık, tarım, kozmetik, endüstri, kriminal vb.) kullanılmak üzere ilmiğe dayalı izotermal amplifikasyon (LAMP) teknolojisi ile nükleik asitlerin amplifikasyonunu ve tayin edilmesini sağlayan düşük maliyetli ve pratik bir nükleik asit tetkik cihazına ilişkindir.

Önceki Teknik

Nükleik asit amplifikasyonu, bulaşıcı hastalıkların ve genetik bozuklukların incelendiği klinik tıp alanı da dahil olmak üzere tüm yaşam bilimlerinde kullanılan en değerli araçlardan biridir. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yüksek duyarlılık ve seçiciliği nedeniyle günümüzde nükleik asit amplifikasyonu ve tayin edilmesi için en yaygın olarak kullanılan yöntemdir. PCR sistemlerinin çalışması ve sonuçların işlenerek analiz edilebilmesi için özel olarak eğitim almış profesyoneller tarafından çalıştırılması gerekmektedir. Ayrıca PCR sistemlerinin yanlış pozitif sonuçlar üretme ihtimali olduğundan oldukça temiz numuneler kullanılması gerekmektedir. Bunun yanında, söz konusu sistemlerde ısı sikluslarına ihtiyaç duyulduğundan Thermocycler gibi daha pahalı ekipman kullanımını da gerektirmektedir. Bu nedenle PCR sistemleri pahalıdır ve kullanımı tam donanımlı laboratuvarlar ile sınırlanmıştır.

CN106995841A belgesinde genetik yapısı değiştirilmiş soya fasulyelerinin tespit edilmesi için bir yöntem ve bir çoklu PCR teçhizatı açıklanmaktadır. Söz konusu yöntemin avantajı yüksek duyarlılığa sahip olması, ekonomik ve hızlı olması ve gıda analizinde kullanılabilmesidir. KR20030084184A belgesinde genetik yapısı değiştirilmiş organizmalar ve ürünlerin tespiti ve miktarlarının ölçülmesi için bir primer ve bunun için bir yöntem açıklanmaktadır. US20030148278A1 belgesinde PCR kullanılarak genetik yapısı değiştirilmiş organizmaların tetkiki için bir yöntem ve teçhizat açıklanmaktadır. US6287772B1 belgesinde gerçek zamanlı PCR kullanılarak genetik yapısı değiştirilmiş soya fasulyelerinin belirlenmesi için bir analiz yöntemi açıklanmaktadır. Ancak söz konusu buluşlar PCR sistemi ile

çalıştığından masraflıdır ve özel laboratuvar ekipmanlarının kullanılmasını ve testlerin konuda uzmanlaşmış profesyoneller tarafından gerçekleştirilmesini gerektirmektedir.

US20090118136A1 belgesinde genetik yapısı değiştirilmiş ekinler ve bitkilerdeki nükleotid sekanslarının optik ince-film biyosensör yongalar kullanılarak belirlenmesi için bir analiz yöntemi açıklanmaktadır. Söz konusu analiz yöntemi, incelenecek bir numune, numunedeki renk değişiminin belirlenmesi ve numunenin en az bir DNA sekansı içerdiğinin belirlenmesi adımlarını içermektedir. Bu yöntemin dezavantajı, biyosensörün üretiminin oldukça pahalı olmasıdır.

Yukarıda açıklanan önceki teknikte bulunan nükleik asitlerin amplifikasyonunu ve tayin edilmesini sağlayan cihazlar ve yöntemlerin dezavantajlarının üstesinden gelecek yani bir nükleik asit tetkik cihazına ihtiyaç duyulmaktadır. Mevcut buluş, nükleik asit amplifikasyonu için izotermal amplifikasyon yöntemlerinden faydalanan bir cihaz ve yöntem açıklamaktadır. İzotermal amplifikasyon yöntemleriyle, PCR için gerekli olan ısı sikluslarına ihtiyaç duyulmadan sabit ısıda etkili ve hızlı bir şekilde nükleik asit amlifikasyonu yapılabilmektedir.

Buluşun Amaçları

Önceki tekniklere atıfla bu buluş, nükleik asit varlığının tespit edilmesi istenen alanlarda kullanılmak üzere nükleik asitlerin amplifikasyonunu ve tayin edilmesini sağlayan nükleik asit tetkik cihazı önermektedir.

Buluşun başka bir amacı da nükleik asit amplifikasyonu için izotermal amplifikasyon yöntemlerinden faydalanan bir cihaz sunmaktır. Tercihen söz konusu cihaz ilmiğe dayalı izotermal amplifikasyon (LAMP) yönteminden faydalanmaktadır. LAMP sabit ısıda hızlı ve etkili nükleik asit amplifikasyonu sağlamaktadır. LAMP yönteminin ise reaksiyon süresinin ortalama 30 dakika olduğu, tek bir ısı bloğu ile 60-65°C ısıda ve sonuçların çıplak gözle görülebilmektedir.

Buluşun başka bir amacı da kullanım kolaylığı sağlayan ve tetkik sonuçlarını hızlı olarak üretebilen bir nükleik asit tetkik cihazı sunmaktır.

Buluşun başka bir amacı da özel olarak eğitim almış bir profesyonelden ziyade daha geniş bir kullanıcı grubu tarafından çalıştırılması mümkün olan bir nükleik asit tetkik cihazı sunmaktır.

Buluşun Kısa Açıklaması

Bu buluşun amaçlarına ulaşmak için gerçekleştirilen, ilk istem ve bu isteme bağlı diğer istemlerde tanımlanan buluş, özel bir teknoloji ve laboratuvar ekipmanı ve uzmanlık gerektirmeden pratik ve güvenilir olarak nükleik asit tetkiki yapmak için bir cihazdır. Buluş konusu cihaz, güvenli, ucuz ve kullanıcı dostudur.

Buluş konusu DNA tetkik cihazı LAMP yöntemine dayalı olarak DNA tetkiki gerçekleştirmektedir ve söz konusu cihazın tetkik sonuçlarını bir kontrol penceresi üzerinden renk değişimi ile sunmaktadır. Buluşun avantajları harici güç kaynağına sahip olmaksızın çalıştırılabilme, taşınabilirlik, gerçek zamanlı reaksiyon gözlene bilirliği ve PID sıcaklık kontrol çevrimi özelliklerine sahip olmasıdır.

Buluşun yapısal ve karakteristik özellikleri ve tüm avantajları aşağıda açıklamaları verilen şekiller ve bu şekillere atıflar yapılmak suretiyle yazılan detaylı tarifname kısmı sayesinde daha net olarak anlaşılacaktır ve bu nedenle istemlerin değerlendirmesinin de bu şekiller ve detaylı tarifname göz önüne alınarak yapılması gerekmektedir. Ekli resimlerde verilen parçaların bireysel ve komşu parçalara göre bağıl boyutları örnek olarak sunulmuş olup boyutlar mevcut buluşun yapısal ve işlevsel özellikleri bakımından sınırlandırıcı biçimde yorumlanmamalıdır.

Şekillerin Kısa Açıklaması

Bu buluşun amacına ulaşmak için gerçekleştirilen biyo gösterge tespit cihazı ve buna ek olarak bu cihaz tarafından kullanılan biyo algılayıcı ve mikro akışkan tabanlı kartuş ile uygulaması ekli şekillerde gösterilmiş olup bu şekiller;

Şekil 1: Mevcut buluşa göre sunulan DNA tetkik cihazının üst perspektif görünümüdür.

Şekil 2: Mevcut buluşa göre sunulan DNA tetkik cihazının patlatılmış ön perspektif görünümüdür.

Buluşun Ayrıntılı Açıklaması

Şekillerdeki parçalar tek tek numaralandırılmış olup, bu numaraların karşılığı aşağıda verilmiştir.

1	Üst kapak
2	Numune seti
3	Tüp yuvası
4	Gövde
5	Görüntüleme penceresi
6	Alt kapak
7	PCB yuvası
8	PCB kapağı
9	Isıtıcı
10	PCB
11	Mikroişlemci
12	Sıcaklık sensörü dönüştürücüsu
13	Güç yükselteci
14	Sıcaklık sensörü
15	Dahili güç kaynağı
16	Vida
17	Amplifikasyon tüpü
20	DNA tetkik cihazı

Mevcut buluş, nükleik asitlerin amplifikasyonunu ve tayin edilmesini sağlayan ve yerinde (Point-of-Care) tahlil yapan bir DNA tetkik cihazı (20) olarak tarif edilmiştir.

DNA tetkik cihazı (20), nükleik asitlerin amplifikasyonunun gerektirdiği ekipmanların karmaşıklığını ve miktarını azaltmak için tercihen bir izotermal amplifikasyon yöntemi kullanmakta, daha tercihen ilmiğe dayalı izotermal amplifikasyon (LAMP) yöntemi kullanmaktadır.

LAMP tepkimesinde hedef bölgeye özgü DNA'daki altı ayırt edici bölgeyi tanıyabilen 4 ile 6 primer kullanılmaktadır. Tepkime süresi ortalama 30 dakika olup sadece bir ısı bloğu veya termos benzeri bir ısıtıcı yardımıyla 60-65°C ısıda gerçekleştirilebilmektedir. LAMP tepkimesi ile numunede hedef nükleik asidin

olup olmadığı boya maddeleri kullanılarak renk değişikliği ve flüoresans, veya turbidite gözlemlenerek belirlenebilmektedir. Bu tür renk değişikliği, flüoresans veya turbidite ölçümleri bir kullanıcı tarafından çıplak göz ile veya spektrofotometrik veya flüoresans görüntüleme gibi bir görüntüleme tekniği ile gerçekleştirilebilmektedir. LAMP tepkimesi süresince renk değişiminin takip edilebilmesi için kullanılabilecek boya maddelerinden bazıları şunlardır: Hydroxy Naphthol Blue (HNB), SYBR Green, Calcein, , Propidium Iodide veya Crystal Violet.

Mevcut buluşa konu DNA tetkik cihazının (20) yapısı Şekil 1 ve 2'de gösterilmektedir. DNA tetkik cihazı (20), bir numune seti (2) ihtiva eden bir gövde (4) ve numune setinin (2) yalıtımını ve sızdırmazlığını sağlayan bir üst kapak (1) ihtiva etmektedir. Numune seti (2) içine birer adet amplifikasyon tüpü (17) yerleşecek şekilde 4 adet tüp yuvası (3) içermektedir. Ancak teknikte uzman kişinin takdir edeceği üzere DNA tetkik cihazı (20) daha fazla veya daha az amplifikasyon tüpü (17) taşıyacak şekilde uyarlanabilmektedir. Gövde (4) üzerinde bulunan görüntüleme penceresi (5) LAMP tepkimesinin gerçek zamanlı olarak gözlemlenebilmesine imkan tanımaktadır. Görüntüleme penceresi (5) camdan yapılmıştır ve bu şekilde kullanıcının çıplak göz ile tepkimeyi gerçek zamanlı olarak takip etmesinin sağlamanın yanında ısı kaçağını da engellemektedir. LAMP tepkimesinin gerçek zamanlı olarak görüntüleme penceresinden (5) amplifikasyon tüplerindeki (17) renk değişimi ile gözlemlenebilmesi, tepkimenin sonuçlarının 30 dakikadan daha kısa bir süre içerisinde öngörülmesine imkan tanımaktadır.

Gövde (4), numunelerin yerleştirildiği amplifikasyon tüplerinin (17) yanında ısıtıcıyı (9) ve PCB (10) üzerince bulunan sıcaklık kontrol elemanlarını da içermektedir. PCB (10) gövdede (4) bulunan bir PCB yuvası (7) üzerine yerleştirilmekte ve bir PCB kapağı (8) ile örtülmektedir. PCB (10) üzerinde bulunan elemanlar bir mikroişlemci (11), bir sıcaklık sensörü (14), bir sıcaklık sensörü dönüştürücüsü (12) bir dahili güç kaynağı (15) ve bir güç yükseltecidir (13).

Amplifikasyon tüpleri (17) numune setinin (2) içine ilk olarak yerleştirildiğinde gövde (4) içindeki sıcaklık ortam sıcaklığı ile aynıdır. Gövde (4) içindeki sıcaklık bir sıcaklık sensörü (14) ile ölçülmektedir. Sıcaklık sensörü dönüştürücüsü (12),

sıcaklık sensöründen (14) gelen analog sıcaklık verisini dijital veriye dönüştürerek mikroişlemciye (11) iletmektedir. Mikroişlemci (11) PID kontrol algoritması ile alınan sıcaklık verisini, istenen sıcaklık verisi ile karşılaştırmaktadır.

LAMP tepkimesi için istenen sıcaklık değeri 65°C'dir. Gövde (4) içindeki sıcaklık 65°C'den düşük olduğunda güç yükselteci (13) ısıtıcıya (9) akım göndererek dahili güç kaynağı (15) aracılığıyla gövde (4) içindeki sıcaklığın yükseltilmesini sağlamaktadır. Gövde (4) içindeki sıcaklık 65°C'den yüksek olduğunda güç yükselteci (13) ısıtıcıya (9) akım göndererek dahili güç kaynağı (15) aracılığıyla gövde (4) içindeki sıcaklığın düşürülmesini sağlamaktadır. Gövde (4) içindeki sıcaklık 65°C olduğunda güç yükselteci (13) ısıtıcıya (9) akım göndererek dahili güç kaynağı (15) aracılığıyla gövde (4) içindeki sıcaklığın sabit tutulmasını sağlamaktadır. Bu süreç LAMP tepkimesinin gerçekleşmesi için 30 dakika boyunca devam etmektedir.

Bu sayede DNA tetkik cihazının (20) ısı kontrolü sürecinde herhangi bir soğutma sistemine gerek duyulmamaktadır. LAMP tepkimesi sabit sıcaklıkta (65°C) gerçekleşmektedir, yani PCR tepkimesi gibi ısı sikluslarına ihtiyaç duyulmadığından, vantilatörler, kanatlar veya soğutma sıvısı soğutma sistemlerine de ihtiyaç duyulmamaktadır. Bundan dolayı DNA tetkik cihazı (20), önceki teknikte bulunan benzer cihazlara göre daha küçük bir hacime sahiptir. Bu sayede DNA tetkik cihazının (20) ısıtılması için harcanan enerji daha az olacaktır. DNA tetkik cihazı (20) harici güç kaynağına gerek duyulmadan, bir batarya yardımı ile çalıştırılabilmektedir. Böylece DNA tetkik cihazı (20) hafiftir ve taşınması kolaydır.

Mevcut buluşun tercih edilen bir uygulamasında nükleik asit varlığının tespit edilmesi istenen alanlarda kullanılmak üzere ilmiğe dayalı izotermal amplifikasyon (LAMP) teknolojisi ile nükleik asitlerin amplifikasyonu ve tayin edilmesi için, bir gövde (4) içinde en az bir amplifikasyon tüpü (17) yerleşecek şekilde bir numune seti (2) ve bir ısıtıcı (9) ihtiva eden bir DNA tetkik cihazı (20) sunulmaktadır.

Mevcut buluşun tercih edilen bir unsuru uyarınca özelliği, söz konusu gövdenin (4), numune seti (2) ile aynı hizada ve amplifikasyon tüpleri (17) gövde (4)

dışından çıplak göz ile görünebilecek şekilde konumlanmış bir görüntüleme penceresi (5) ihtiva etmesi,

Mevcut buluşun tercih edilen bir unsuru uyarınca özelliği, söz konusu DNA tetkik cihazının (20) bir PCB (10) üzerinde PID kontrol algoritması ile gövde (4) içindeki sıcaklığı ayarlayan bir mikroişlemci (11) ve bir dahili güç kaynağı (15) ihtiva etmesidir.

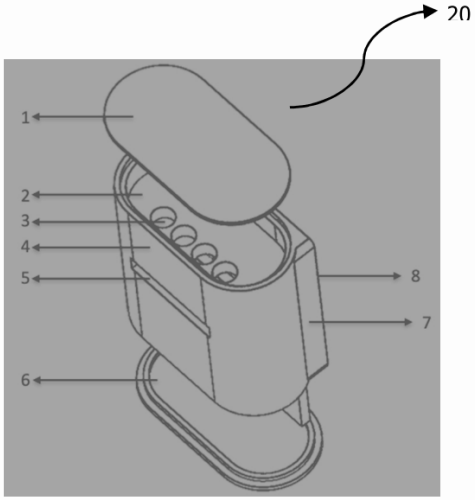
Mevcut buluşun tercih edilen bir unsuru uyarınca özelliği, söz konusu görüntüleme penceresinin (5) cam malzemeden yapılmış olmasıdır.

Mevcut buluşun tercih edilen bir unsuru uyarınca özelliği, söz konusu PCB (10) üzerinde gövde (4) içindeki sıcaklığı ölçmek için bir sıcaklık sensörü (14), bir sıcaklık sensörü dönüştürücüsü (12) ve bir güç yükselteci (13) ihtiva etmesidir.

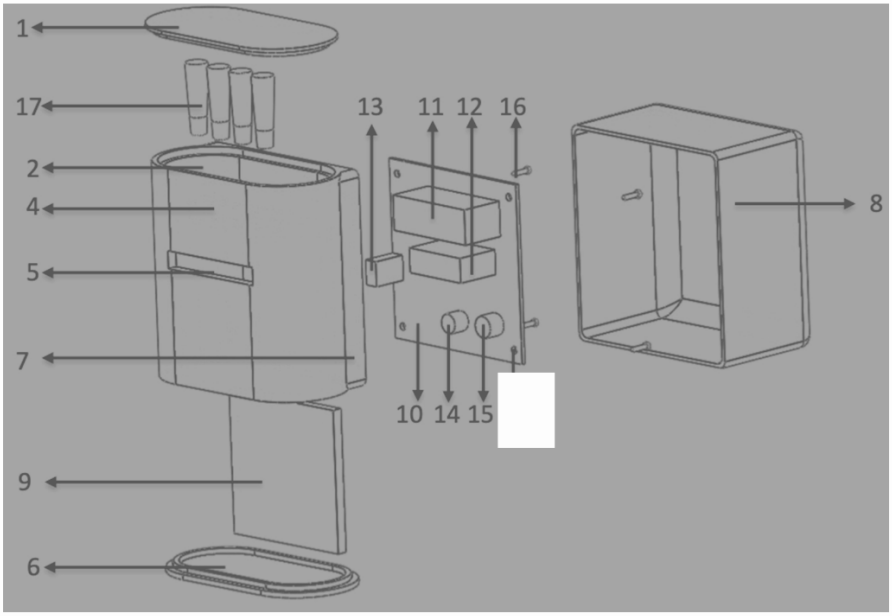
Mevcut buluşun tercih edilen bir unsuru uyarınca özelliği, söz konusu mikroişlemcinin (11) gövde (4) içindeki sıcaklık verisine dayanarak güç yükseltecinin (13) ısıtıcıya (9) akım göndermesini sağlayarak dahili güç kaynağı (15) aracılığıyla gövde (4) içindeki sıcaklığın değiştirilmesini veya sabit tutulmasını sağlayacak şekilde yapılanmış olmasıdır.

Mevcut buluşun tercih edilen bir unsuru uyarınca özelliği, söz konusu amplifikasyon tüpü (17) içerisinde gerçekleşen LAMP tepkimesi süresince renk değişiminin takip edilebilmesi için boya maddesi olarak Hydroxy Naphthol Blue (HNB) bulunmasıdır.

Mevcut buluşun tercih edilen bir unsuru uyarınca özelliği, söz konusu numune setinin (2) içine birer adet amplifikasyon tüpü (17) yerleşecek şekilde 4 adet tüp yuvası (3) ihtiva etmesidir.



Şekil 1



Şekil 2