

(19)



(10) **LT IP684 A**

(12) **PARAIŠKOS APRAŠYMAS**

(21) Paraiškos numeris: **IP684**

(51) Int. Cl. (2006): **G01N 27/447**

(22) Paraiškos padavimo data: **1993 06 23**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **1995 01 31**

(62) Paraiškos, iš kurios dokumentas išskirtas, numeris: —

(86) Tarptautinės paraiškos numeris: —

(86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: —

(85) Nacionalinio PCT lygio procedūros pradžios data: —

(30) Prioritetas: **739123, 1991 07 31, US**
5011228, 1992 01 31, SU

(71) Pareiškėjas:

**E.I. Du Pont de Nemours and Company, 1007 Market Street, Wilmington,
Delaware 19898, US**

(72) Išradėjas:

Lynne Elizabeth ANDERSON, US
Robert Kenneth KOBOS, US
Shay Evan POLSKY, US
Charles William ROBERTSON, US

(74) Patentinis patikėtinis/atstovas:

**Liudmila GERASIMOVICH, IĮ „Liudmila Gerasimovič, Patentinis patikėtinis“,
Vingrių g. 13-42, LT-01141 Vilnius, LT**

(54) Pavadinimas:

**Įrenginys, skirtas darbui su membranomis elektroforezei ir
chemiliuminescentiniam nustatymui absorbuotų ant membranų produktų, šio
įrenginio panaudojimo būdai**

(57) Referatas:

—

5

10

ĮRENGINYS, SKIRTAS DARBUI SU MEMBRANOMIS ELEKTROFOREZEI IR
CHEMILIUUMINISCENTINIAM NUSTATYMOI ADSORBUOTŲ ANT MEMBRANŲ
PRODUKTŲ; ŠIO ĮRENGINIO PANAUDOJIMO BŪDAI

15 Šis išradimas nagrinėja įrenginį, skirtą nustatyti, o po to
ir identifikuoti gel-elektroforezės ir blotingo produktus.
Konkrečiai, jis liečia įrenginį, skirtą darbui su blotingo
membranomis, ant kurių yra šios medžiagos, be to, skirta
detektuojamo signalo, generuojamo iš atitinkamai apdorotų
20 atskirtų biologinių medžiagų juostų, stiprinimui.

Gel-elektroforezė paprastai yra naudojama molekulinėje
biologijoje molekulių sudėtinių dalių atskyrimui bandinyje,
remiantis jų dydžiu ir krūviu. Klasikinis pavyzdys yra šių
25 dalelių perkėlimas ant membranų. Į perkėlimo procedūrą, arba
blotingą, įeina tekančio srauto apdorojimas, kaip Southern
(pietinis) blotingo arba elektroblotingo metu pagal JAV pat.
No 4589965. Produktas, vadinamas blotu, yra apdorojamas taip,
kad vizualiai arba kitomis aptikimo priemonėmis būtų galima
30 pastebėti atskirų molekulių juostas. Pavyzdžiui, kai į
apdorojimą įeina radioaktyvus žymėjimas, tada yra naudojamas
autoradiografinis detektavimas. Kaip aprašyta JAV patente No
4874492, dviejų dimensijų krūvio ryšį nustatančiame prietaise
yra naudojamos fluorescentinės žymės, paveikiamos iš
35 ultravioletinių spindulių šaltinio.

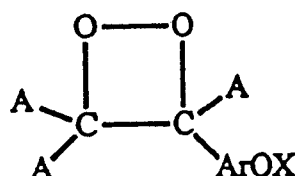
Geriausias metodas sukurti paruoštą detektavimui signalą yra
cheminės liuminescencijos metodas, kuris remiasi tam tikrų

pakeistų 1,2-dioksetanų, fermentiniu sužadiniu. Įvairūs tokio sužadavimo aspektai yra pateikti daugelyje patentų.

JAV pat. No 4857652 Schapp duoda liuminescencinio 1,2-dioksetano formulę:

5

10

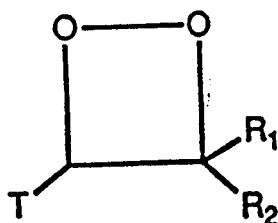


kur ArOX yra aromatinis žiedas su pakeista X oksigrupe, o A
15 yra pasyvios organinės grupės, įgalinančios 1,2-dioksetaną spinduliuoti šviesą, paveikiant jį tuo metu, kai pašalinamas X. X yra chemiškai judri grupė, kuri yra pašalinama aktyvatoriumi. 1,2-dioksetano dalys gali būti sužadinamos liuminescuoti kambario temperatūroje.

20 Edwards ir kt. JAV pat. No 4952707 pateikia bendrą fermentiškai skaidomų 1,2-dioksetanų aprašymą. Šis patentas aprašo fermentiškai skaidomų cheminės liuminescencijos 1,2-dioksetanų formulę:

25

30



kur R₁ reiškia vandenilį arba cheminę jungtį, kai R₂ yra
35 pakaitalas, susijęs su dioksetano žiedu per spiro-jungtį, arba organinis pakaitalas, kuris nedaro poveikio šviesos išskyrimui; R₂ yra florofolo likutis, turintis kondensuotą

daugiabranduolinį žiedą ir fermentiškai skaidomą judrų žiedo pakaitalą; T yra stabilizuojanti grupė, neleidžianti dioksetano junginiui išsiskaidyti prieš tai, kai fermentiškai yra nutraukiamas skaidomo judraus žiedo pakaitalo ryšys.

- 5 Bronstein ir kt. JAV pat. No 4956477 taip pat aprašo fermentiškai skaidomų 1,2-dioksetanų sintezę, taikomą cheminės liuminescencijos imunoanalizei ir tiesioginei fermentų analizei.

- 10 Schaap JAV pat. No 4959182 aprašo metodą ir sudėtį, duodančius padidintą 1,2-dioksetanų cheminę liuminescenciją.

Pagal šį metodą fermentiškai skaidomas 1,2-dioksetanas yra sumaišomas su jautriu paviršiniu sluoksniu, o florescentinė dalis yra prijungiama prie angliavandenilio, sudarant jautrų paviršinių sluoksnių micelėje arba kitoje struktūroje. Šis būdas

- 15 duoda fermentiškai paveikiamos cheminės liuminescencijos signalo stiprinimą 500 kartų 1,2-dioksetanų tirpaluose. Be to, Bronstein ir kt. (J. Biolumin. Chemilumin. 4, 99-111, 1989)

rašo, kad jaučių serumo albuminas ir kitos tirpstančios vandenyje makromolekulės žymiai stiprina cheminį liuminescentinį signalą, generuojamą iš fermentiškai skaidomų 1,2-dioksetanų tirpalų. Manoma, kad visi tie stiprintojai didina anijonų pusiauproduktų ir šviesą spinduliuojančių medžiagų stabilumą, laikant jas hidrofobinėje aplinkoje.

- 20 Tačiau hidrofobinio pagrindo atveju, pvz., nailono membranų atveju, šis pagrindas anijoninėms medžiagoms perduoda hidrofobinę aplinką. To pasėkoje šie stiprintojai neduoda žymesnio stiprinimo tuo atveju, kai fermentas yra apribotas hidrofobiniu pagrindu.

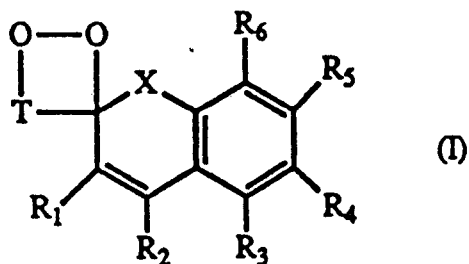
- 30 Okada ir kt. Australijos paraiškoje patentui A 36340/89 aprašo metodą cheminės liuminescencijos signalo stiprinimui, skirtą fermentiškai sužadintiems 1,2-dioksetanams. Fermentinė reakcija yra atliekama, esant optimaliai fermento pH reikšmei. Po to pH yra didinamas, pridedant stiprią bazinę medžiagą, kad būtų sustiprintas liuminescentinis efektas.

- 35 Bandant su polistiroliniais rutuliukais buvo pasiektas signalo sustiprinimas nuo 7 iki 59 kartų.

Paraiškoje WO 89/06650 Bronstein ir kt. nagrinėja dioksetanų panaudojimo klausimus pavyzdžiuose, įskaitant fluorescencinį chromoforą, turintį spiro-ryšį su dioksetano 4 anglies atomu. Dioksetano formulė yra

5

10



kur X yra CR₇R₈, O, S arba R-R (kur kiekvienas R₇, R₈ ir R nepriklausomai yra H, alkilas, heteroalkilas, arilas, heteroarilas, cikloalkilas, cikloheteroalkilas, aralkilas, aklarilas, arba fermentiškai hidrolizuojama grupė). Kiekvienas R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ ir R₆ nepriklausomai yra H, elektroną akceptuojanti grupė, elektroda atiduodanti grupė, heteroarilas arba fermentinė hidrolizinė grupė, arba grupės R₁-R₆, kartu sudarančios žiedą. T yra pakeistas arba nepakeistas arilas, poliarilas, cikloalkilidenas arba policikloalkilideno grupė, spiro-susieta su dioksetano 3 anglies atomu. Šie dioksetanai yra naudojami tyrimuose, norint aptikti tam tikrą susijusios poros narį arba fermentą.

Hummelen ir kt. JAV patente No 4705847 nagrinėja pakeičiamo policiklo-alkilideno policiklo alkanų, tokių, kaip pakeistas adamantilidenas, adamantanas ir atitinkami epidioksiniai junginiai, paruošimo procedūrą. Policikloalkilideno policiklo alkanai yra halogenuoti ir to pasėkoje halogeninis produktas pasirinktinai patenka į pakeitimo reakciją. Gaunami produktai yra paverčiami į atitinkamus epidioksinius junginius. Čia yra aprašyti įvairūs epidioksiniai junginiai, kurie turi dioksetano žiedą. Šie junginiai yra naudingi kaip termocheminės liuminescentinės žymės.

Erwin ir kt. JAV patente No 49488775 aprašo kiekybinę liuminescentinę vaizdo sistemą, kuri galimybę išmatuoti žemus šviesos lygius, gaunamus liuminescencinių reakcijų metu

elektromagnetiniuose laukuose, pvz., mikrobanginiame spinduliavime ir jos panaudojimą cheminės liuminescencijos tyrimuose ir terminėje mikrodozimetrijoje. Mikrobanginio spinduliavimo efektas cheminėje liuminescencijoje yra

5 aprašytas patente ir publikacijoje (Kiel, Bioelectromagnetics 4, 193-204, 1983) žymiai skiriasi nuo šio aprašymo. Į aprašytą sistemą fermentinės reakcijos, ypač liuminolio oksidavimas, katalizuojamas peroksido fermentų ir proteino želatina, skysčio išlaikoma drėgname būvyje. Stiprinimas, paveiktas dėl

10 mikrobanginio spinduliavimo, priklauso nuo padidėjusio substrato mobilumo (vandenilio peroksidas) želatinos viduje, bet ne dėl faktinio cheminės liuminescencijos proceso stiprinimo, kaip čia yra aprašyta.

JAV pat. No 4812216 ir su juo susijusiame pat. No 4913791 yra

15 aprašytas metodas ir įrenginys, skirti darbui su bloting-membranomis blotingo, hibridizacijos ir detektavimo metu. Juose yra aprašomi metodas ir įrenginys, skirti blotingo membranų manipuliavimui ir valdymui proceso, analizės ir saugojimo metu. Į aprašytą įrenginį įeina priemonės membranos

20 palaikymui (atramos) kartu su vienu arba daugiau lizdų, sąveikaujančių su fiksatoriais taip, kad membrana būtų priimama iš lizdo ir lizdą visada orientuota tokioje pačioje padėtyje. Taip pat yra aprašytas metodas, į kurio panaudojimą įeina atramos, atitinkamai pritvirtintos viena prie kitos

25 (savitarpio fiksatoriaus ar klijų pagalba) ir kurio dėka membrana yra patogiai valdoma atramomis, nepažeidžiant pačios membranos arba ant jos esančios biologinės masės. Membrana yra transportuojama, kaip viena detalė ir arba iš apdorojimo postų. Tačiau šiuose literatūros šaltiniuose nepateikti automatizuoti

30 ir valdomi mechanizmai, skirti membranų apdorojimui, įskaitant ir biologinį bandinį, kuriame membrana yra pagal norą prispaudimo galvute prispaudžiama prie šviesą ekranuojančios dalies detektavimo aparate metu.

JAV RE 30595 yra aprašoma konteineris, skirtas pakrauti

35 skaidres su reagentais ir aparatą, kuriame atliekama skystų bandinių kiekybinė cheminė analizė. Stačiakampiame korpuse yra įstatyta kamera, skirta priimti skaidrių paketą. Konteineris

tinka įstatyti į atitinkamos formos lizdą, esantį analizės aparate, o atjungimo priemonės apsaugo nuo įstatymo neteisingoje padėtyje. JAV pat. 4152390 aprašo cheminį analizatorių, į kurį įeina daug kasečių su bandymų skaidrėmis.

5 Skaidrių perkėlimo mechanizmas perduoda skaidres iš kasetės, transportuoja jas į prietaisą, kur jos sušlapinamos skysčiu, ir pristato skaidres transporteriu per šildytuvą į analizės atlikimo vietą. Tačiau šiose nuorodose nėra aprašytas nukreipimo prietaisas, skirtas perkeliama membranai

10 pozicionavimui, o taip pat ir prispaudimo galvutės, skirtos sujungimui ir atpalaidavimui ir šviesą ekranuojančio aparato, kuris parinktinai apgaubia membraną tokiu būdu, kaip tai yra nurodyta šiame išradime.

Šio išradimo tikslas yra sukurti aparatą, skirtą

15 elektroforinių perkeliama blotingo membranų cheminei liuminescencijai, kuris atliktų ir valdytų sekančias funkcijas: priemonės, skirtas membranų priėmimui ir perkėlimui bei jų pastatymui detektavimui, automatizuotai valdytų detektavimo priemonės, skirtas membranų pašalinimui ir

20 priemonės, skirtas gražinti į pradinę padėtį taip, kad būtų galima apdoroti sekančią membraną.

Sekantis šio išradimo tikslas yra sukurti aparatą, tinkamą cheminės liuminescencijos detektavimui ir kuriame būtų stiprinamas cheminės liuminescencijos signalas. Šio išradimo

25 požymių sudaro prispaudimo galvutės įkomponavimas į aparato sudėtį, kuri iškreipia membraną ir pagal norą papildomai ją kaitina tam, kad būtų pagerintas signalo stiprumas. Šio išradimo pranašumas yra tai, kad čia aprašyti aparatas ir būdas įgalina atlikti tikslų ir valdomą elektroforinių

30 bandinių apdorojimą, minimaliai įsikišant kvalifikuotam laborantui. Šio išradimo šie ir kiti tikslai, požymiai ir pranašumai bus aiškūs pagal toliau sekanti šio išradimo aprašymą.

Šiame išradime yra aprašytas patobulintas aparatas, skirtas

35 elektroblotingo membranų manipuliavimui ir detektavimui, į kurį įeina standus rėmelis (i), kuris palaiko elastingą membraną (ii) pagal jos periferiją, membrana (ii), turinti

detektuojamą elektroforetinį blotą ir pats detektorius. Į patobulinimą įeina:

- (a) kreipiančiųjų mechanizmas, skirtas pastatyti blotingo membraną taip, kad ji būtų pozicionuota padėtyje, skirtoje susijungimui su prispaudimo galvute (b) ir po to detektavimui;
- (b) prispaudimo galvutė, pastatyta kreipiančiųjų mechanizmo atžvilgiu taip, kad galėtų susijungti su membrana (ii) ir ją atpalaiduoti;
- (c) šviesą ekranuojantis aparatas pastatytas kreipiančiųjų atžvilgiu taip, kad pasirinktinai galėtų apgaubti blotingo membraną ir
- (d) priemonės, skirtos nuosekliai valdyti aparato darbą, kad prispaudimo galvutė susijungtų su membrana (ii) tada, kai blotingo membrana yra tokioje padėtyje, kuri tinka detektavimui atlikti.

Taip pat yra aprašomas pagerintas virš minėtų elektroforinių membranų manipuliavimo ir detektavimo būdas. Į patobulinimą įeina:

- (a) blotingo membranos pozicionavimas kreipiančiajame mechanizme susijungimui su prispaudimo galvute (b) ir po to detektavimui;
- (b) membranos (ii) sujungimas su prispaudimo galvute tuo metu, kai membrana yra minėtame kreipiančiųjų mechanizme taip, kad galėtų nukreipti membraną (ii) nuo standaus rėmelio (i);
- (c) šviesą ekranuojančio aparato pastatymas kreipiančiųjų atžvilgiu taip, kad pasirinktinai būtų galima apgaubti blotingo membraną ir
- (d) blotingo membranos detektavimas prispaudimo galvutės susijungimo su membrana (ii) metu, kaip pagal p. (b) ir šviesos ekranavimo įrenginio valdymas tokiu būdu, kaip yra nurodyta p. (c).

Elektroblotingo produkto detektavimas pagal siūlomą įgyvendinimo atvejį, yra atliekamas:

- (a) atitinkamai apdorojama membrana (ii), ant kurios yra detektuojamas blotas su fermentiškai sužadinais 1,2-dioksetanais;
- (b) membranos (ii) džiovinimas;

(c) papildomas membranos (ii) kaitinimas kartu su džioviniu arba po jo ir

(d) detektavimas 1,2-dioksetanų cheminės liuminescencijos, susijusios su elektroblotingo produktu, atliekant džiovinimą ir (arba) kaitinimą prieš arba kartu su detektavimu.

Be to, membranos (ii) kaitinimas gali būti atliekamas kaitinimo priemonėmis, esančiomis prispaudimo galvutėje.

TRUMPAS BRĖŽINIŲ APRAŠYMAS

10

Fig. 1 yra aksonometrinis blotingo membranos ir jos rėmelio vaizdas.

Fig. 2 yra dalių, naudojamų su detektavimo modulių pagal išradimą, schema.

15 Fig. 3 yra šoninis vertikalus dalinis detektavimo modulio skerspjūvis.

Fig. 4 yra šoninis vertikalus membraną apdorojančio modulio dalies skerspjūvis.

20 Fig. 5 yra smulkesnis prispaudimo galvutės, parodytos Fig. 4, skerspjūvis.

Fig. 6 yra šoninis vertikalus membraną apdorojančio modulio dalies skerspjūvis.

Kaip matoma iš Fig. 1, yra parodyta elektroblotingo elastinė membrana, turinti standų rėmelį 28, kuris laiko elastinę membraną 30. Elastinė membrana 30 yra pritvirtinta mechaniškai arba klijuojama ir pan. standžiame rėmelyje 28. Standaus rėmelio 28 dydis yra truputį didesnis už elastinės membranos 30 plotį, abiejose pusėse paliekant tarpelį 90 taip, kad kai membrana kontaktuoja su prispaudimo galvute, elastinė membrana 30 yra pastumiama nuo standaus rėmelio 28 plokštumos. Rėmelis 28 turi pratęsimą 92, skirtą patogesniai darbui ir tam, kad liktų vietos identifikatoriaus žymei, tokiai kaip brūkšnių kodas 94. Tipinė membrana arba atrama yra padarytos iš nailono, turinčio modifikuotą paviršių ar pan., paprastai ant kokio nors pagrindo, kaip 1,5 mm storio neaustinės medžiagos pagrindas. 35 Tokios plonos membranos yra ne tik pakankamai tvirtos, bet ir

labai elastingos. Tokiu būdu rėmelis 28 suteikia membranai pastovumą darbo metu.

Šios membranos su rėmeliais gali būti naudojamos rankinio darbo metu, tačiau geriausiai yra naudotis automatizuotais įrengimais. Bakterinių bandinių identifikavimui galima naudotis metodika, aprašyta Webster, JAV pat. No 4717653. Toks įrenginys gali turėti tokių modulį, koks yra aprašytas šiame išradime. Tokiu pat būdu membranos su rėmeliais gali būti naudojamos su moduliu pagal šį išradimą, veikiančiu, kaip savarankiškas prietaisas. Bet kuriuo atveju identifikavimo procesas yra pagerinamas, supaprastinant operatoriaus darbą, pagerinant proceso metu gautų rezultatų pasikartojamumą ir to pasėkoje, čia aprašyto automatizuoto stiprinimo metodo pasėkoje, žymiai sumažinant cheminės liuminescencijos detektavimą nuo trukmės valandomis iki minučių.

Elastinę membraną 30, sumontuotą standžiam rėmelyje 28, ir ant paviršiaus turinčią blotingo produktą, gautą ankstesnio elektroforezės proceso metu, apdoroja 1,2-dioksetanu, kaip čia buvo aprašyta, norint ją paruošti cheminės liuminescencijos detektavimui. Po to ji yra perkeliama, kaip tai yra parodyta Fig. 2, į detektavimo modulį 300, kuriame ji yra pozicionuojama registravimui prietaise 500. Kaip tokios paskirties prietaisą, geriausiai yra naudoti kamerą CCD, veikiančią krūvių perkėlimo principu. Duomenys iš kameros 500 yra perduodami į proceso valdymo bloką 400, geriausiai, mini kompiuterį, kuriame atliekamas identifikavimas, naudojant metodą, kaip tas, kuris yra aprašytas Hubner, JAV pat. No 4885697.

Nuosekliai ir tinkamai sinchronizuotas apdorojimas taip pat yra valdomas iš bloko 400, kuris paleidžia veikti įvairius variklius, kaip 328, kad būtų atliktos reikiamos funkcijos. Valdymo blokas 400 taip pat turi analitines priemones identifikavimui atlikti, kaip buvo aukščiau minėta.

Pagal Fig. 3, modulis 300 turi tris pagrindines dalis: kamerą 302 (ir kamerą 500, kuria gali būti perkeliama elektrinių krūvių kamera CCD, tokia, kaip Star 1/A, gaminama firmos Photometrics Ltd, Tucson, AZ), šviesos praėjimo vamzdį 304 ir

- rémelio valdymo bloką 306. Reikia pastebėti, kad šioje
schemoje nėra parodytas padavimo mechanizmas, kadangi modulis
pilnai tinka arba rankiniam rémelių idėjimui vienas po kito,
arba automatiniam jų padavimui iš kasetės. Rémelių
5 manipuliavimo blokas 306 yra po priekiniu gaubtu 308, kuris
apsaugo jį nuo šviesos ir turi idėjimo plyšį 310 ir išėmimo
plyšį 312 rémeliams su membranomis arba atramų detalėmis
įstatyti. Blokas 306 yra pritvirtintas detalėmis, kurios
brėžinyje nėra parodytos, prie pagrindo 314, kuris su
10 pagrindiniu gaubtu 316 sudaro šviesos vamzdį 304, dengiantį
optinę ašį, praeinančią tarp kameros galvutės 302 ir
pastatytos membranos 30. Detalės yra sutvirtintos viena su
kita tvirtinimo detalėmis, kurios brėžinyje taip pat nėra
parodytos.
- 15 Modulis 300 turi sekančias funkcijas: jis leidžia įstatyti į
rémelio manipuliavimo bloką atitinkamai įrėmintą ir apdorotą
membraną, paruoštą juostų detektavimui Southern, Northern arba
Western (pietų, šiaurės, vakarų) metodais atlikti, palaiko
membraną detektoriaus židinio atstume (čia pastatyta CCD
20 kamera), esant tamsos sąlygoms, atlieka 1,2-dioksetano, esančio
ant membranos, cheminės liuminescencijos intensyvumo terminį
stiprinimą ir po to, kai ant membranos esantis vaizdas yra
užfiksuotas detektoriumi, išmeta membraną, o visa tai yra
atliekama, atitinkamai valdant veiksmų tvarką.
- 25 Smulki rémelių manipuliavimo bloko konstrukcija yra matoma iš
Fig. 4. Kreipiančiųjų mechanizmas (a) dar gali turėti rémelio
kreipiančiąsias 340, turinčias plyšį 338, priderintą taip, kad
į jį įtilptų membrana, susijungimo su prispaudimo galvute (b)
metu ir atlikus detektavimą rėmelį galima būtų iš jo išimti.
- 30 Prispaudimo galvutė 318 yra pritvirtinta kronšteinu prie
detalės 320, kuri sukasi apie ašį A, esančią detalėje 322,
pritvirtintoje neparodytomis brėžinyje tvirtinimo detalėmis
prie konstrukcijos 324, kuri yra mazgo 314 tęsinys. Tokiu
būdu, prispaudimo galvutė 318 gali susijungti ir atpalaiduoti
35 elastinę membraną 30. T. y., prispaudimo galvutė 318
susijungia su membrana 30 tada, kai elektroforinė membrana yra
pastatoma detektavimui, tačiau idėjimo ir išėmimo metu nuo

membranos 30 ji yra atpalaiduojama. Variklio apkaba 326 yra pritvirtinta prie prispaudimo galvutės 318 detalėmis, kurios brėžinyje nėra parodytos, apkaboje yra padarytas plyšys ir kiaurymės variklio 328 montavimui. Variklis gali būti

5 reduktorinio tipo (pastovios srovės variklis su krumpliaratiniu reduktoriumi, kaip "Maxon", No 2322846 - 11, 112 - 000, gaminamas firmos Maxon, 838 Mitten rd, Burlingame, CA). Dinaminis stabdymas yra atliekamas žinomos schemos pagalba. Variklis yra pritvirtintas prispaudėju, kuris

10 brėžinyje nėra parodytas. Kumštelis 330 yra užtvirtintas ant variklio 328 veleno varžtu 332 ir sujungtas su kumšteliu per sekiklį 334 (kuriuo gali būti 1/4 colio STOCK DRIVE gaminys No A7Y5-CF2512). Jis kontaktuoja kumštelio plyšyje, esančiame detalės 324 kronšteine, kuris parodytame skerspjūvyje

15 nesimato, o parodytas, kaip nematoma linija 324'. Variklio veleno sukimasis, pvz., strėle parodyta kryptimi, judina virš aprašytą mazgą iš vienos parodytos kampinės padėties į kitą - "darbo", "pakrovimo" ir "iškrovimo" padėtis, jei toks yra pasirinktas darbo režimas. Detalės yra parodytos darbo

20 padėtyje arba pradinėje padėtyje, o kitos padėtys yra parodytos dalinai nematomais vaizdais. Šviesą ekranuojantis pagal šį išradimą įrenginys (c) turi pirmą šviesos ekranavimo dalį 341, esančią prie ištisinio plyšio 338 blotingo membranų priėmimo zonoje (viršutinėje Fig. 4 dalyje). Be to, įrenginys

25 (c) turi antrą šviesos ekranavimo dalį 335, esančią prie ištisinio plyšio 338 blotingo membranų išėmimo zonoje (apatinėje Fig. 4 dalyje). Abi šviesos ekranavimo dalys 341 ir 335 turi padėtis "atidaryta" ir "uždaryta". Tai yra, kai įrenginys yra pozicionuojamas į padėtį, skirtą priimti

30 elektroforezinę membraną, pirmasis šviesos ekranas 341 yra atidarytas ir leidžia membranai patekti į plyšį 338, o antrasis šviesos ekranas 335 yra uždarytas ir neleidžia membranaipatekti į plyšį 338. Tokiu būdu membrana yra įdedama į bloką ir pozicionuojama kontaktui su prispaudimo galvute

35 318. Detektavimo metu pirmasis ir antrasis šviesos ekranai yra "darbo" padėtyje ir gerai apsaugo nuo šviesos patekimo į darbo

zoną detektavimo metu. Po detektavimo antrasis šviesos ekranas pakankamai prasiveria, praleisdamas membraną pro plyšį. Pirmasis ir antrasis šviesos ekranai 341 ir 335, geriausiai atveju, susideda iš pirmo ir antro sverto 342 ir 336, su

5 kuriais yra sujungtos pirmoji ir antroji užtvaros 341' ir 336'. Jos yra pastatytos taip, kad galėtų užtvirti šviesą, einančią per plyšį 338, o pirmasis ir antrasis šviesos ekranai 341 ir 335 galėtų veikti taip, kad uždengtų šviesą ir galima būtų atlikti detektavimą. Pirmasis ir antrasis svertai 342 ir 336

10 yra sujungti taip, kad galėtų veikti ir dirbtų vienu metu, koordinuojami pagal įdėjimo ir išėmimo operacijas. Antrasis svertas 336 yra pritvirtintas prie prispaudimo galvutės 318, svyruoja kartu su ja ir yra parodytas pradinėje padėtyje. Antroji užtvvara 336' uždaro vertikalios šviesos praėjimo

15 tarpelius plyšyje 338 nuo einančio iš apačios aplinkos apšvietimo. Ištinis plyšys 338 yra tokio dydžio ir priderintas prie įdėjimo ir išėmimo plyšių 310, 312 (gaubto dalis), kad netrukdytų rėmeliams su membranomis praeiti apdorojimui. Atkreipkite dėmesį į tai, kad įdėjimo metu

20 pirmoji užtvvara 342' pilnai uždengia plyšį 338, duodama galimybę įstatyti membraną, tačiau antroji užtvvara 336' neatidengia plyšio ir veikia kaip stabdys. Kadangi ji juda į pilno uždarymo padėtį, tokiu būdu ji prilaiko rėmelį 30 teisingoje vertikalioje padėtyje.

25 Vienas ištinis plyšio 338 šonas yra padarytas taip, kad būtų kaip rėmelio kreipiančioji 340, kuri, geriausiai, yra pagaminta iš techninės plastmasės, turinčios gerą stiprumą ir žemą slydimo trintį, pvz., DELRINTM (firmos E. I. du Pont de Nemours and Company, Wilmington, DE gaminy). Ištinis plyšio

30 338 viršus darbo metu yra uždarytas pirmuoju šviesos ekranu 341 (konkrečiai, pirmąją užtvvara 342'). Jis svyruoja apie ašį B (žr. punktyrines linijas), kuri gali sukinėtis konstrukcijos 324 atžvilgiu per atitinkamus kronšteinus, kurie brėžinyje nėra parodyti ir laiko kumštelio plokštę 344, kurioje yra

35 kumštelio plyšys 346. Kumštelio sekiklis 348, kuris yra analogiškas sekikliui 334, yra pritvirtintas prie prailgintos variklio apkabos 326 ir liečiasi su kumštelio plyšiu 346.

Fiksavimo kumštelis 330 periferijoje turi plačią vėliavėlę 352 ir siaurą vėliavėlę 354. Jos išsikiša tiek, kad galėtų paveikti sensorius 356, 358, kurie yra sumontuoti žiediniame takelyje spausdintos plokštės 360, savo ruožtu pritvirtintos prie prispaudimo galvutės 318 ir turinčios visą elektros schemą. Geriausiu atveju yra naudojami du fotoelektriniai sensoriai, tokie kaip H2311, pagaminti firmos Harris ir kurių kiekvienas yra siūstuvai ir imtuvai.

Šviesos srautas yra pertraukiamas, kai pro jį praeina vėliavėlės. Tokiu būdu yra sudaromas valdymo signalas. Sensorius 356 yra "stop" sensorius - kai vėliavėlė 352 jį uždengia ir grąžina į pradinę padėtį sensorių 358, tada variklis 328 yra sustabdomas pradinėje padėtyje arba 0 laipsnių padėtyje. Tada yra pasiunčiamas signalas į CCD kamerą, kad ji pradėtų veikti. Vėliavėlės 354 dydis yra toks, kad vienu metu galėtų uždengti tik vieną sensorių, ji yra atitolinta nuo antrosios vėliavėlės ir duoda signalą, rodantį, kad detalių grupė yra pakrovimo padėtyje, o tai yra ties 7 laipsnių padėtyje. Signalas yra perduodamas į išorinį įėjimo bloką, jei toks yra, arba į operatoriaus indikatorius, kad būtų perduodamas sekantis rėmelis 28. Ties 13 laipsnių padėtim yra atliekamas iškrovimo procesas, kurio metu yra atidaromas plyšio 338 dugnas ir rėmelis 28 yra išmetamas iš modulio svorio jėgos dėka.

Prispaudimo galvutės 318 konstrukcija smulkiau yra parodyta Fig. 5. Galvutės pagrindas 350 yra pagamintas iš techninės medžiagos, turinčios geras izoliacines savybes, tokios kaip DEL-RINTM. Šis pagrindas membranos ir atramos kontaktiniame gale turi formą, leidžiančią jam praeiti per rėmelio 28 kiaurymę. Šis galas turi kreivalinį paviršių 352, prie kurio yra pritvirtinamas reguliuojamas elektrinis šildytuvas 354, pvz., Minco Part No HR5435R17.9L12A, turinti K tipo folgos termoporą. Tvirtinimas atliktas sluoksniu vulkanizacija. Tokiu pat būdu prie šildytuvo yra pritvirtinta prispaudimo plokštelė 356, kuri yra pagaminta iš aliuminio arba panašios medžiagos, esančios geru šilumos laidininku. Prispaudimo plokštelė 456 turi kontūrą, tinkamą tam, kad

prilietimo metu nukreiptų elastingą membraną nuo standaus
rėmelio 28. Kai kurie elektriniai šildytuvai yra parduodami
savuose korpusuose ir jei yra tokie naudojami, o šilumos
galingumas yra atitinkamo dydžio, prispaudimo plokštelė 356
5 gali būti pašalinta.
Darbo metu variklis 328 sukasi ir nuo iškrovimo padėties (13
laipsnių) judina visas dalis, besisukančias ašies A atžvilgiu
prieš laikrodžio rodyklę, veikiamas kumštelio sekiklio 334 ir
kumštelio 324'. Pirmasis svertas 342 svyruoja apie ašį B pagal
10 laikrodžio rodyklę, verčiamas kampinio kumštelio sekiklio 348
judesio kumštelyje 346. Pakrovimo padėtyje (7 laipsniai)
pirmoji užtvara 342' neuždengia išpjovos 338 viršaus, bet
sekančios užtvaros 336' galas vis dar yra žemiau plyšio 338.
Siauroji vėliavėlė 354, atsiradusi ties sensoriumi 356,
15 generuoja signalą, neparodytas išorinis padavimo prietaisas
paduoda (ir numeta dėl svorio jėgos) rėmelį 28 per plyšį 310 į
ištisinį plyšį 338. Rėmelis atsiremia į sekančios užtvaros
galą. Po iš anksto užduoto laiko tarpo variklis 328 sukasi
tol, kol plačioji vėliavėlė 352 neatsidurs pradinėje padėtyje,
20 kaip buvo aprašyta, kumštelio judesys perstumia abu - pirmąjį
ir antrąjį - svertus 342 ir 336 taip, kad jie uždengtų, kaip
parodyta, per plyšį 338 einančią šviesą. Prispaudimo galvutė
318 yra perstumiama pirmyn taip, kad jos priekinė dalis,
prispaudimo plokštė 356, susiliečia su užpakaline membranos
25 arba atramos 30 paviršiumi ir lenkia ją lauk ir su įvarža
prastumia ją per rėmelio 28 apertūrą. Šildytojas 352,
pastoviai šildomas iki nustatytos ir, kaip aprašyta,
reguliuojamos temperatūros, perduoda šiluminę energiją
membranos arba atramos šildymui ir tokiu būdu stiprina vaizdą.
30 Veikia kamera 500.
Vaizdas yra perduodamas į valdymo prietaisą 400 ir
apdorojamas. Po užduoto laiko tarpo sukimasis atnaujinamas ir
ties 13 laipsnių iškrovimo padėtimi, antrosios užtvaros 336'
galas, maksimaliai atitrauktas, numeta į atliekas rėmelį 28,
35 kuris praeina per išėjimo plyšį 312 (neparodyta). Po to ciklas
gali būti pakartotas. Dabar jau galima suprasti, kad
besisukantis fiksavimo kumštelis 330 ir susiję su juo

mechaniniai elementai sudaro išstūmimo mechanizmą, judinantį membranų rėmelius 30 modulyje.

- Pagal šią išradimą aprašytas detektavimo modulis tinka naudoti automatiniam membranų apdorojimo aparate. Fig. 6 parodytas
- 5 įgyvendinimo pavyzdyje toks modulis yra pritaikytas autonomiškam darbui, perduodant rėmelius 28 rankiniu būdu. Fig. 6 yra parodytas tokio modulio dalies aksonometrinis vaizdas. Jo priekinis gaubtas yra pakeistas, kad tikėtų rankinio padavimo mazgui 362, kuris yra pritvirtintas
- 10 detalėmis, kurios brėžinyje nėra parodytos. Du priekiniai grioveliai 364 ir 366 yra virš išpjovos 310, esančios gaubte 308 ir turi vietos slystančiam rėmeliui 28 įdėjimui. Surinkimo vienetas 362 yra pagamintas iš techninės plastmasės, turinčios mažą trinties koeficientą, tokios kaip DELRINTM, pagamintos
- 15 firmoje E. I. du Pont de Nemours and Company, Wilmington, DE 19898. Išpjovos anga yra uždaroma nuimama pertvarėle 368, kuri yra sumuntuota su paspyruokliuota jungtimi, kurios prijungimas ir valdymas iš solenoido 370 nėra parodytas. Surinkimo vieneto 362 užpakalinėje dalyje yra sumontuotas ventiliatorius 372,
- 20 tokiu būdu, iš aplinkos oras yra pučiamas strėlės 374 kryptimi, apimdamas membraną 30 tuo metu, kai su ja sujungtas rėmelis 28 atsiremia į užtvartą 368.
- Darbo metu laborantas paima membraną ir rėmelį 30, 28, ant kurių yra paskirstytas blotas, paruoštas detektavimui
- 25 (procedūra, kuri pagrįsta cheminės liuminescencijos principu - nusodinimas, izoliavimas, įsisavinimas, deproteinizavimas) ir įdeda jį į išpjovą 364, 366 tokiu būdu, kad rėmelio 28 apačia remtųsi į atramą 368. Pradedama veikti valdymo blokas 400. Ventiliatorius 364 pučia orą į membraną 30, pašalindamas po
- 30 ankstesnio apdorojimo likusią drėgmę. Po nustatyto laiko signalas iš bloko 400 paveikia solenoidą 370 ir atrama 368 yra atitraukiama, leidžiant rėmeliui 28 nukristi per išpjovą 310. Po to vyksta apdorojimas, kaip buvo anksčiau aprašyta. Operatoriui įsikišti nereikia tol, kol atidirbusi membrana ir
- 35 rėmelis 30, 28 neiškrenta iš išpjovos 312, esančios gaubte 308, kai valdymo blokas atliko identifikavimą.

Detektavimo modulis 300 ir metodas, pagal kurį jis dirba, yra aprašyti pagal Webster naudojamus mikroorganizmų nustatymo terminus. Kiti atvejai (naudojant atitinkamą aparatūrą ir su ja susijusią metodologiją) turi būti aiškūs tos srities specialistams. Į juos įeina baltymų nustatymas, naudojant Western blotingą, ELISA ir RNA analizę, naudojant Northern blotingą.

- Prieš detektavimą sausinant membraną, nepaisant naudojamo metodo, yra gaunamas 4-6 kartus geresnis signalas. Geriausias rezultatus davė karštas džiovinimas krosnelėje, tačiau toks pat efektas buvo pastebėtas, džiovinant vakuume, ore arba kaitinimo lempa. Papildomas efektas atsiranda tada, kai membrana yra kaitinama vaizdo fiksavimo metu, pavyzdžiui, su CCD kamera, t.y., membrana yra kaitinama tuo metu, kai yra fotografuojamas jos vaizdas. Sausa membrana arba šlapia membrana gali būti kaitinamos vaizdo fiksavimo metu, kadangi membrana, kaitinama pašildymo bloke, džiūsta labai greitai. Šių operacijų panaudojimas yra nauja koncepcija farmaciniu būdu sukeliamoje chemijos liuminescencijoje. Žymus stiprinimas yra pasiekiamas tada, kai tyrimo buferiu yra naudojamas karbonato buferis. Žymiai mažesnis stiprinimas yra pasiekiamas tada, kai tyrimo buferiu yra naudojamas vienas iš kitų bendros paskirties buferių, naudojamų šarminiams fosfatavimo tyrimams, t. y., Tris, dietanolaminas ir 2-amino-2-metyl-1-propanolis.
- Čia nagrinėjama keletas džiovinimo kombinacijų su arba be pavyzdžio kaitinimo. Reikia apžvelgti kiekvieną išradimo proceso atvejį pagal specialius tyrinėtojų poreikius. Taip, praktiškai geriausiomis procedūromis yra bandinio džiovinimas prieš detektavimą, bet, naudojant kaitinimą, geriau jį naudoti detektavimo metu, kaip ir kaitinimas - džiovinimas detektavimo metu. Kai kuriais atvejais, kai kaitinimas detektavimo metu praktiškai netinka, pvz., detektavimo atveju, naudojant rentgeno spindulius arba fotojuostą, tada geriausiai tinka džiovinimas, kaitinant prieš detektavimą.
- Tarp kitų tinkamų kaitinimo ir/arba džiovinimo kombinacijų (ir jų poveikio detektavimo operacijai) galima nurodyti: vien tik bandinio džiovinimą (be toliau sekančio kaitinimo, kadangi

pavyzdys yra sausas) prieš detektavimą; bandinio džiovinimą ir po to jo kaitinimą; bandinio džiovinimą atskirai detektavimo metu (nors praktiškai tam skirtas laikas įtakos neturi, kadangi signalas po to, kai membrana yra išdžiūvusi, kuri
5 laiką lieka pastovus); bandinio džiovinimą ir kaitinimą vienu metu su detektavimu.

Standaus pagrindo, ant kurio yra bandinys, "džiovinimu" yra vadinamas toks procesas, kurio metu nuo bandinio yra pašalinamas likęs tirpalas arba kiti skysčiai. Nepretenduoju
10 į kokią nors ypatingą teoriją, galima paaiškinti apie džiovinimo naudą tuo, kad procesas pagerėja dėl skysčio molekulių pašalinimo nuo bandinio (paprastai, membranos). Šios skysčio molekulės proceso metu gali susidurti su kitomis sužadintomis molekulėmis, tokiu būdu, yra prarandama mažiau
15 energijos dėl jos išbarstymo susidūrimo metu, o to pasekoje atsiranda kvantiniai efektai. Džiovinimo metu yra pašalinamos skysčio molekulės, o tai pašalina cheminės liuminescencijos slopinimą dėl susidūrimų. Membranos džiovinimas prieš
detektavimą 4-6 kartus padidina signalo stiprumą, lyginant su
20 įprastiniais metodais, kurių metu membrana yra laikoma šlapia nuo substrato skysčio. Membrana turi būti visiškai sausa, kad galėtų pajusti pilną stiprinimo efektą.

Džiovinimo metu standus pagrindas atitinkamą laiką yra išlaikomas temperatūroje, prisilaikant procedūros, pasirinktos
25 iš vakuuminio džiovinimo, konvekcinio džiovinimo, džiovinimo ore, mikrobanginės ir elektros energijos panaudojimo. Tokiu būdu, pakanka vakuuminėje sistemoje džiovinti apytikriai nuo 15 iki 30 minučių, esant aplinkos temperatūrai. Konvekcinis džiovinimas (naudojant, pvz., konvekcinius šildytuvus) yra
30 atliekamas apytikriai 5-30 minutes, esant temperatūrai 30-100°C. Džiovinimas ore yra atliekamas per 30 min. arba ilgiau (keletą valandų), esant aplinkos temperatūrai. Džiovinimas priklauso nuo eilės parametrų, pvz., membranos sudėties ir jos drėgmės. Džiovinimo sąlygos turi būti optimizuojamos
35 kiekvienam atvejui. Čia pateiktos sąlygos buvo paruoštos nailono 8x8 cm dydžio membranoms, arba mažesnėms, kurioms

blotingas buvo atliktas prieš džiovinimą, pašalinant skysčio perteklių.

Membranos džiovinimo metodas yra parenkamas, vadovaujantis patogumu. Vienintelis reikalavimas yra tas, kad membrana būtų
5 pilnai išdžiovinta. Geriausias procesas yra elektrinis drėgnų membranų, iš anksto padžiovintų, kaitinimas detektavimo su CCD kamera metu. Šiam tikslui yra skirtas elektrinis šildytuvas 454, esantis prispaudimo galvutėje 318. Tam tikru mastu prie džiovinimo prisideda ir ventiliatorius 372. Optimalios sąlygos
10 priklausys nuo aplinkybių. Kai kuriais atvejais gali būti pageidautina gauti didžiausią signalą per trumpiausią laiko tarpą. Tam tikslui reikia panaudoti aukštą temperatūrą, pvz., 100°C. Gali būti pageidautina, kad emisija būtų lėtesnė, tada yra naudojama, pvz., 70-80°C temperatūra ir tuo metu gali būti
15 padaroma daugelis ekspozicijų, keičiant jų trukmę. Tokiu būdu, didesnės koncentracijos takeliai yra fiksuojami (registruojami), esant trumpesnėms ekspozicijoms, o mažesnės koncentracijos takeliai yra fiksuojami (registruojami), esant ilgesnėms ekspozicijoms. Ši galimybė didina sistemos dinaminį
20 diapazoną.

Standaus pagrindo, ant kurio yra bandinys, "kaitinimu" yra vadinamas toks procesas, kurio metu po to, kai nuo bandinio yra pašalintas likęs tirpalas, bandiniui yra perduodama šiluma ar kita energijos rūšis, pakelianti bandinio temperatūrą. Vėlgi
25 nepretenduojant į kokią nors ypatingą teoriją, galima paaiškinti apie kaitinimo naudą tuo, kad procesas pagerėja dėl to, kad kaitinimas greičiau ir pilniau suskaido tarpinio produkto molekules. To pasekoje per trumpiausią laiką yra pasiekiamas intensyviausias signalas, lyginant su įprastiniais
30 metodais, nenaudojančiais kaitinimo. Kaitinimo metu standus pagrindas atitinkamą laiką yra išlaikomas temperatūroje, prisilaikant vienos iš procedūrų, pagal kurią į įrenginį gali būti įmontuotos techninės priemonės, tokios, kaip elektrinis šildytuvas 454, įmontuotas į prispaudimo galvutę 381.
35 Elektrinio kaitinimo kartu su detektavimo metu, prieš tai nusausinga membrana yra džiovinama konvekciniame džiovintuve per 10-30 min. laiko tarpą, esant temperatūrai 40°C. Po to

membrana nuo 30 sekundžių iki 10 minučių yra kaitinama elektriniu šildytuvu 454, esant temperatūrai 40-100°C. Signalas yra matuojamas, naudojant CCD kamerą. Yra padaroma serija nuotraukų, paprastai nuo 30 sek. iki 2 min., ir yra
5 atrenkamas vaizdas, kurio signalo santykis su fonu yra geriausias.

Kaitinimas paprastai yra atliekamas 1-10 min., esant 40-100°C.

Kaitinimas taip pat gali būti laikomas vienu iš būdų išdžiovininti membraną. Tarp membranos džiovinimo bet kokiomis
10 priemonėmis prieš detektavimą ir šlapios arba sausos membranos kaitinimo detektavimo metu yra skirtumas. Yra manoma, kad jei membrana detektavimo metu nėra kaitinama, pagrindinis stebimas efektas yra džiūvimo procesas, nežiūrint į tai, koks buvo panaudotas džiovinimo metodas. Kaitinimas detektavimo metu
15 užtikrina didžiausią stiprinimo efektą.

Tikimasi, kad čia aprašyti džiovinimo ir kaitinimo metodai yra gerai suprantami šios srities specialistams, be to, čia išvardintos priemonės daugiau yra skirtos pailiustravimui ir neapima visų galimų priemonių, galimų panaudoti čia
20 pareiškiamame procese.

Taip pat suprantama, kad įvairios čia aprašytos džiovinimo ir kaitinimo priemonės gali būti optimizuotos, kad atitiktų atskirus tyrinėtojo poreikius.

Sustiprintas cheminės liuminescencijos detektavimo metodas
25 pagal šį išradimą yra taikomas fermentinėms kietos fazės analizėms, kurių metu yra naudojama 1,2-dioksetanų substratai, duodantys pusiau stabilius tarpinius produktus. Kadangi šis procesas geriausiai gali būti panaudotas plačiai naudojamoms 1,2-dioksetanų cheminės liuminescencijos sistemoms, čia darome
30 nuorodą į JAV patentų aprašymus No 4931223 ir No 4952707, įtrauktus į prototipų skaičių. Taip pat yra žinomos daugelis publikacijų, kuriose yra aprašyti fermentiškai sužadinami 1,2-dioksetanai, skirti fermentinių imunoanalizių atlikimui (Bronstein et al., J. Biolumin. Chemilumin. 4, 99-111, 1989),
35 Southern Blotting (Bronstein et al., BioTechniques 8, 310-314, 1990) ir DNA sequencing (Tizard et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 87, 4514-4518, 1990).

Šios analizės remiasi vienos molekulės tarpusavio ryšio su kita panaudojimu. Prie specifinių sąveikaujančių porų priklauso: antikūniai - antigenai, nukleino rūgščių bendrosios jungtys, jungiantis proteinas - vitaminas ir jungianti

5 proteino - nukleino rūgštis. Vienas susijungiančios poros narys yra perkeliamas ir imobilizuojamas ant kieto pagrindo. Po to pagrindas yra inkubuojamas į tirpalą, turintį antrąją susijungiančios poros narį, kuris yra arba tiesiogiai pažymėtas su fermentu, arba turi rišančiąją grupę, pvz.,

10 biotiną arba avidiną, kurie toliau gali surišti fermentinę žymę. Pastaruoju atveju, pagrindas yra inkubuojamas tirpale, turinčiame fermentinę žymę. Toliau pagrindas yra inkubuojamas tirpale, turinčiame atitinkamą 1,2-dioksetano substratą, naudojama kaip fermentinė žymė. Pavyzdžiui, gali būti

15 naudojamas 3-(2'-spiroadamantanas)-4-metoksi-4-(3''-fosforiloksi)fenil-1,2-dioksetanas, kai fermentinė žymė yra šarminė fosfatazė, o kai fermentinė žymė yra β -D-galaktozidazė, tada naudojamas 3-(2'-spiroadamantanas)-4-metoksi-4-(3''- β -D-galakto-piranoziloksifenil)-1,2-

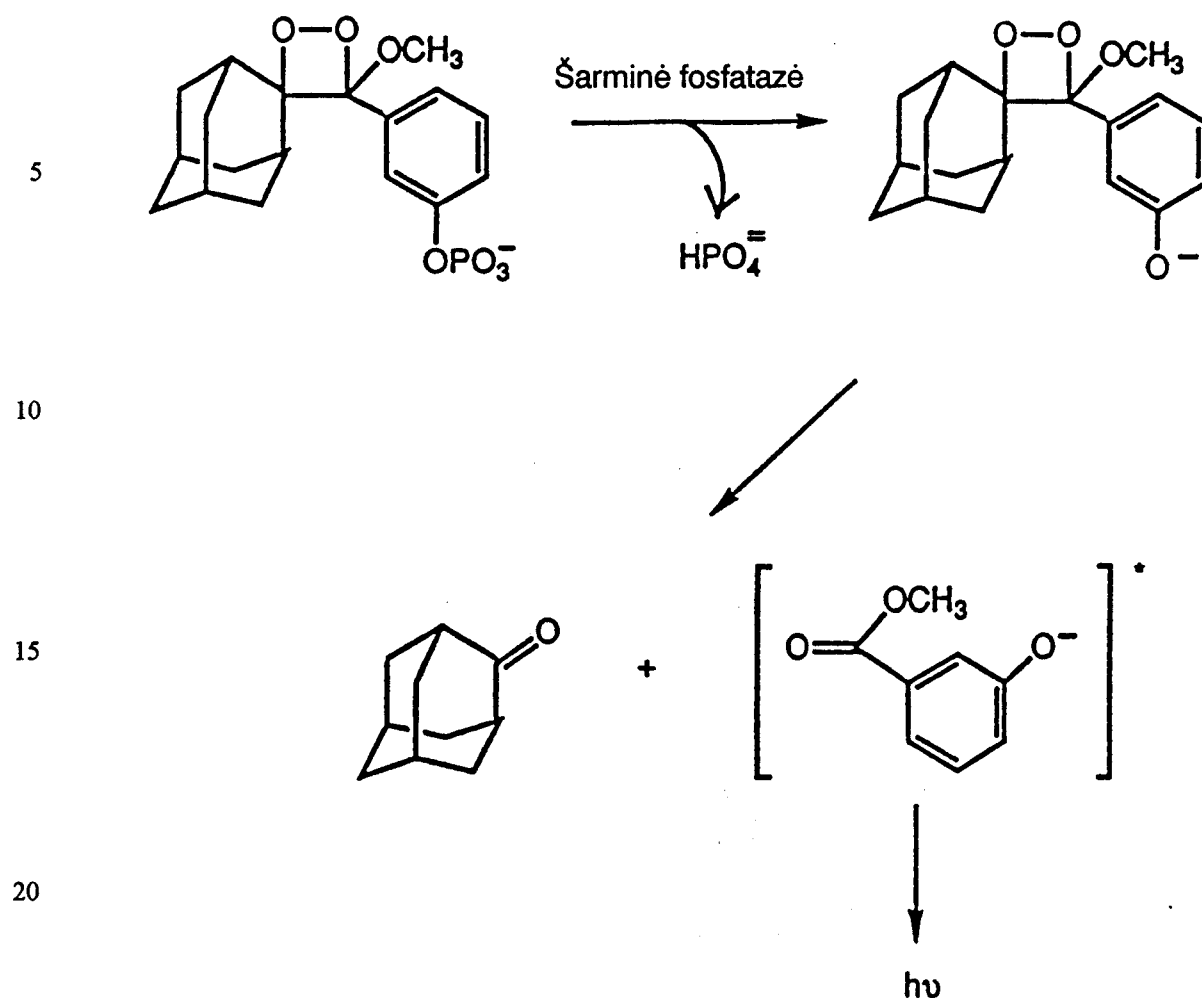
20 dioksetanas. Kai kurių plačiai naudojamų analizių metu yra atliekama kietos fazės imunofermentinė analizė (ELISA), DNA titravimas ir Southern blotingas.

Fermentinės reakcijos metu iš 1,2-dioksetano yra pašalinama fermentinė hidrolizuota grupė, sudarant anijoninį tarpinį

25 produktą. Šio tarpinio produkto pusė gyvavimo sudaro keletą valandų po jo adsorbavimo ant hidrofobinio pagrindo, pvz., nailono membranos.

Tarpinis produktas, suirus dioksetano žiedui, sudaro du karbonilo junginius. Pagaliau vienas iš tų junginių turi

30 sužadintų elektronų būvį, kuris nustoja aktyvumo po spindulinės energijos emisijos. Vykstančių reakcijų pavyzdys yra sekantis:



30 Džiovinimo ir pasirenkama šildymo operacijos yra atliekamos su kietu pagrindu, po inkubavimo substrato tirpale, o cheminės liuminescencijos signalas yra išmatuojamas taip, kaip buvo anksčiau aprašyta. Pagrindo kaitinimas padidina cheminės liuminescencijos signalą, gal būt dėl to, kad daugiau skatina tarpinio anijono skilimą.

35 Geriausiai tinkami kieti pagrindai yra hidrofobiniai, tokie kaip nailono membranos, polimeriniai rutuliukai, mikrotitravimo lėkštelės. Jie yra naudojami analizei, norint

atskirti surištas fermentų žymes nuo nesurištų. Kieto pagrindo parinkimas priklauso nuo atliekamos analizės tipo. Paprastai imunologinėms analizėms yra naudojami polimeriniai rutuliukai ir mikrotitravimo lėkštelės, nors taip pat yra naudojamos ir
5 membranos. Membranos gali būti naudojamos bet kuriai analizei, kuri reikalauja blotingo ir gelelektroforezės, t. y., Southern, Western ir Northern blotingui. Paprastai daugiausiai yra naudojami kieti pagrindai - tai polimeriniai rutuliukai, mikrotitravimo lėkštelės ir membranos. Tačiau pagrindas gali
10 turėti bet kokią pavidalą, pvz., mėgintuvėlio arba mentelės. Hidrofobinis pagrindas yra tinkamiausias, nes jis duoda hidrofobinę aplinką, kuri stabilizuoja anijoninį 1,2-dioksetano tarpinį produktą. Teoriškai yra aiškinama, kad naudojant hidrofobinį pagrindą stiprinimas būtų žymiai
15 mažesnis, kadangi tarpinis produktas irtų greičiau. Substancijos bendrasis partneris yra imobilizuojamas ant kieto pagrindo. Pavyzdžiui, jei ant pagrindo esąs tikslas yra DNA, tada yra naudojamas DNA bandinys. Imunologinei analizei yra naudojama antikūnio - antigeno pora. Antroji surišanti dalis
20 gali būti tiesiogiai pažymėta nukleino fermentu, arba ji gali būti modifikuojama ir turėti antrąją jungiančią dalį, kuri po to suriš fermento žymę. Čia aprašytoje sistemoje ant membranos yra imobilizuojamas DNA taikiny. Surišimo dalimi yra bendrasis DNA bandinys, modifikuotas taip, kad jame būtų
25 vitaminas biotinas. Po hidridizavimo, kurio metu bendrosios DNA šakos yra atkaitinamos, yra pridedamas avidino - šarminės fosfatazės junginys. Avidinas yra surišamasis proteinas, kuris yra stipriai susijęs su biotinu. Tokiu būdu, biotino ir avidino kompleksacija prie DNA bandinio pritvirtina fermentinę
30 žymę. Šarminė fosfatazė yra naudojama tada, kai 1,2-dioksetanas yra 3-(2'-spiroadamantanas)-4-metoksi-4-(3''-fosforiloksi)fenil-1,2-dioksetanas (paprastai vadinamas AMPPD). Kai 1,2-dioksetanas yra 3-(2'-spiroadamantanas)-4-metoksi-4-(3''-β-D-galakto-piranosiloksi-fenil)-1,2-
35 dioksetanas (paprastai vadinamas AMPGD), tada papildomai yra naudojama β-D-galaktosidazė.

Cheminės liuminescencijos intensyvumo matavimas yra atliekamas bet kuriomis iš daugelio technikos priemonių, gerai žinomu šios srities specialistams. Metodai kinta taip pat, kaip ir tikslai, kuriems jie yra naudojami. Tokiu būdu, detektavimo stiprinimas gali būti naudingas keliems atvejams, įskaitant kietos fazės analizės, kaip ELISA ir DNA bandinių analizės, jautrumo didinimas. Kitoms analizėms priklauso Southern, Northern ir Western analizės. Stiprinimo procesas pagal šią išradimą yra naudingas, gaunant vaizdą apie nukleines rūgštis arba proteinų blotinę. Šiais atvejais daugiausia yra naudojamas fotografavimas rentgeno spinduliuose. Pirmasis šio stiprinimo proceso pranašumas yra tai, kad jis smarkiai sumažina detektavimo procesui reikalingą laiką, t. y., substrato inkubavimo laiką ir cheminės liuminescencijos signalo detektavimo laiką. Detektavimo procedūra, kuri užimtų keletą valandų, gali būti atliekama per 10 arba mažiau minučių. Kitus įrengimus, reikalingus matavimams atlikti, sudaro rentgeno spindulių arba fotojuosta bei tam reikalui reikalingi komponentai, fotodauginimo prietaisai ir elektroniniai vaizdo detektoriai, tokie, kaip pernešamo krūvio prietaisai (CCD) ir kameros. Turėdami galimybę greitai pagauti didelio intensyvumo vaizdą, galime išvengti kitų inžinerinių problemų, tokių, kaip kameros ataušimas ir fono triukšmo lygis.

Čia yra aprašytas patobulintas įrenginys, skirtas manipuluoti ir detektuoti elektroblotingo membranas. Į patobulintą prietaisą įeina kreipiančiųjų mechanizmas, skirtas blotingo membranų įstatymui, prispaudimo galvutė, pastatyta kreipiančiųjų mechanizmo atžvilgiu taip, kad galėtų susijungti ir atsipalaiduoti nuo membranos ir šviesos ekranavimo įrenginys, pastatytas kreipiančiųjų mechanizmo atžvilgiu taip, kad galėtų pasirinktinai apgaubti membraną. Įrenginys veikia taip, kad prispaudimo galvutė susijungia su elastine blotingo membranos dalimi, kurioje yra elektroforinis blotas tuo metu, kai ji yra padėtyje, tinkamoje detektavimui. Čia taip pat yra aprašytas įrenginio, sukurto pagal šią išradimą, panaudojimo būdas. Taip pat čia yra aprašytas būdas, pagal kurį membrana

yra džiovinama ir pasirinktinai kaitinama, o blotingo produktas yra kontaktuojamas su fermentinio sužadavimo 1,2-dioksetanais tam, kad būtų sustiprintas galutinis cheminės liuminescencijos signalas.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

- 5 1. Patobulintas įrenginys, skirtas manipuluoti ir detektuoti elektroblotingo membranas, kuris turi standų rėmelį (i), laikantį elastingą membraną (ii) jos pakraščiais, membraną (ii), ant kurios paviršiaus yra detektuojamas elektroforinis blotingo produktas ir detektorių produktui nustatyti, pasižymintis tuo, kad jis papildomai turi:
- 10 a) kreipiančiųjų mechanizmą, skirtą blotingo membranų pakreipimui tokiu būdu, kad galėtų kontaktuoti su prispaudimo galvute (b) detektavimui;
- b) prispaudimo galvutę, pastatytą minėtų kreipiančiųjų atžvilgiu taip, kad galėtų susijungti ir atsipalaiduoti nuo
- 15 membranos (ii);
- c) šviesos ekranavimo įrenginį, pastatytą minėtų kreipiančiųjų mechanizmo atžvilgiu taip, kad galėtų pasirinktinai apgaubti membraną ir
- 20 d) priemonę, skirtą nuosekliam įrenginio darbui valdyti taip, kad minėta prispaudimo galvutė kontaktuotų su membrana (ii) tuo metu, kai ji yra padėtyje, tinkamoje detektavimui.
2. Įrenginys pagal punktą 1, pasižymintis tuo, kad minėtas kreipiančiųjų mechanizmas (a) turi kreipiančiųjų rėmą, kuris
- 25 savo ruožtu turi ištisinį plyšį tokio pavidalo, kad į jį būtų galima įdėti blotingo membraną sujungiant su minėta prispaudimo galvute (b), ir iš jo išimti membraną po detektavimo.
3. Įrenginys pagal punktą 1, pasižymintis tuo, kad minėta prispaudimo galvutė yra pastatyta su galimybe pasisukti minėtų kreipiančiųjų mechanizmo atžvilgiu ir susijungti bei atsipalaiduoti nuo membranos (ii) pasukamo sverto pagalba.
- 30 4. Įrenginys pagal punktą 3, pasižymintis tuo, kad minėta prispaudimo galvutė papildomai turi prispaudimo plokštę, kuri kontaktuoja su membrana (ii) ir taip pagaminta, kad galėtų užtikrinti membranos slinkimą nuo standaus rėmelio (i) plokštumos susijungimo metu, bei gali turėti kaitinimo
- 35

elementą, pritvirtintą prieminėtos prispaudimo plokštės tokiu būdu, kad prispaudimo plokštė ir kaitinimo elementas yra pritvirtinti prie pasukamo svarto.

5. Įrenginys pagal punktą 2, pasižymintis tuo, kad šviesos
5 ekranavimo įrenginys turi pirmą šviesos ekranavimo elementą, patalpintą greta minėto ištisinio plyšio toje vietoje, kur yra įdedama blotingo membrana, ir turi "uždara" ir "atvira" padėtis, ir antrą šviesos ekranavimo elementą, patalpintą greta minėto ištisinio plyšio toje vietoje, kur yra išimama
10 blotingo membrana ir turinti "atvira" ir "uždara" padėtis, abu elementai sujungti darbui taip, kad kai blotingo membrana yra įstatoma per minėtą ištisinį plyšį, pirmas ekranavimo elementas yra "atidarytas", o antras ekranavimo elementas yra "uždarytas" tiek, kad neleistų membranai praeiti, ko pasekoje
15 detektavimo metu pirmas ir antras ekranavimo elementai yra pakankamai uždaryti, kad apsaugotų nuo šviesos detektavimo metu, o kai blotingo membrana yra išimama per minėtą plyšį, antras ekranavimo elementas yra "atidarytas".

6. Įrenginys pagal punktą 5, pasižymintis tuo, kad minėtas
20 pirmas šviesos ekranavimoelementas turi pirmą svartą, kurio viename gale yra užtvara, esanti šviesos ekranavimo sąveikoje su minėtu ištisiniu plyšiu, o minėtas antras šviesos ekranavimo elementas turi antrąjį svartą su užtvara kitame gale ir ši užtvara, esanti šviesos ekranavimo sąveikoje minėto
25 ištisinio plyšio atžvilgiu; minėti pirmasis ir antrasis svartai yra sujungti galais bedram veikimui.

7. Įrenginys pagal punktą 6, pasižymintis tuo, kad minėtas kreipiančiųjų mechanizmas (a) papildomai turi apsauginį gaubtą su priešpriešinėmis angomis blotingo membranoms įdėti ir
30 išimti, minėta įdėjimo anga yra greta ištisinio plyšio blotingo membranos įdėjimo zonoje, o tarp įdėjimo ir ištisinio plyšio angos yra minėtas pirmas šviesos ekranavimo elementas, ir minėta išėmimo anga yra greta minėto ištisinio plyšio blotingo membranos išėmimo zonoje, o tarp jų yra minėtas
35 antrasis šviesos ekranavimo elementas.

8. Patobulintas įrenginys, skirtas manipuluoti ir detektuoti elektroblotingo membranas, kuris turi standų rėmelį (i),

laikanti elastingą membraną (ii) jos pakraščiais, membraną (ii), ant kurios paviršiaus yra elektroforinis blotingo produktas, ir detektorių produktui nustatyti, pasižymintis tuo, kad turi:

- 5 a) kreipinčiųjų mechanizmą, skirtą blotingo membranų pakreipimui tokiu būdu, kad galėtų kontaktuoti su prispaudimo galvute (b) detektavimui;
- b) prispaudimo galvutę, pastatytą minėtų kreipiančiųjų atžvilgiu taip, kad galėtų susijungti ir atsipalaiduoti nuo
- 10 membranos (ii);
- c) šviesos ekranavimo įrenginį, pastatytą minėtų kreipiančiųjų mechanizmo atžvilgiu taip, kad galėtų pasirinktinai apgaubti membraną;
- d) priemonę, skirtą nuosekliam įrenginio darbui valdyti taip,
- 15 kad minėta prispaudimo galvutė kontaktuotų su membrana (ii) tuo metu, kai ji yra padėtyje, tinkamoje detektavimui ir
- e) priemonę, skirtą elektroforinio blotingo produkto detektavimui, turinčią CCD kamerą, sufokusuotą minėto kreipiančiųjų mechanizmo atžvilgiu tokiu būdu, kad prispaudimo
- 20 galvutei kontakto su membrana metu būtų gautas tinkamas blotingo produkto vaizdas.

9. Įrenginys pagal punktą 8, pasižymintis tuo, kad tarp minėtos CCD kameros ir minėtų kreipiančiųjų (a) yra įterptas elektrovakuuminis fotoelementas, kad užtikrintų tinkamą
- 25 blotingo produkto vaizdo fokusavimą.

10. Pagerintas elektroforinės blotingo membranos, kurią sudaro standus rėmas (i), palaikantis elastingą membraną (ii) jos pakraščiais, pati membrana (ii), ant kurios paviršiaus yra detektuojamas blotingo produktas ir detektorius,
- 30 manipuliavimo ir detektavimo būdas, pasižymintis tuo, kad
- a) blotingo membrana patalpinama kreipiančiajame mechanizme taip, kad galėtų kontaktuoti su prispaudimo galvute (b) ir po to galima būtų atlikti detektavimą;
- b) kai membrana yra minėtame kreipiančiųjų mechanizme, jai
- 35 leidžiama nuslinkti nuo standaus rėmelio (i) plokštumos ir išvykdomas jos kontaktas su prispaudimo galvute;

c) šviesą ekranuojanti priemonė, patalpinama kreipiančiųjų atžvilgiu taip, kad apgaubtų blotingo membraną nuo šviesos, ir d) prispaudimo galvutei kontaktuojant su membrana (ii) kaip p.

(b), ir patalpinant šviesos ekranavimo priemonę kaip nurodyta p. (c), yra detektuojamas elektroforetinio blotingo produktas.

11. Būdas pagal punktą 10, pasižymintis tuo, kad elektroforetinio blotingo produkto detektavimą sudaro:

(a) atitinkamas membranos (ii), ant kurios paviršiaus yra detektuojamas blotingo produktas, apdorojimas fermentiškai

sužadintais 1,2-dioksetanais;

(b) membranos (ii) džiovinimas;

(c) galimas membranos (ii) kaitinimas kartu su džiovinimu arba po jo ir

(d) 1,2-dioksetanų, prisijungusių prie elektroblotingo

produkto cheminės liuminescencijos matavimas, atliekant džiovinimą ir/arba kaitinimą prieš arba kartu su matavimu.

12. Būdas pagal punktą 10, pasižymintis tuo, kad membranos (ii) kaitinimas yra atliekamas kaitinimo elemento, esančio prispaudimo galvutėje, pagalba.

113

FIG. 1

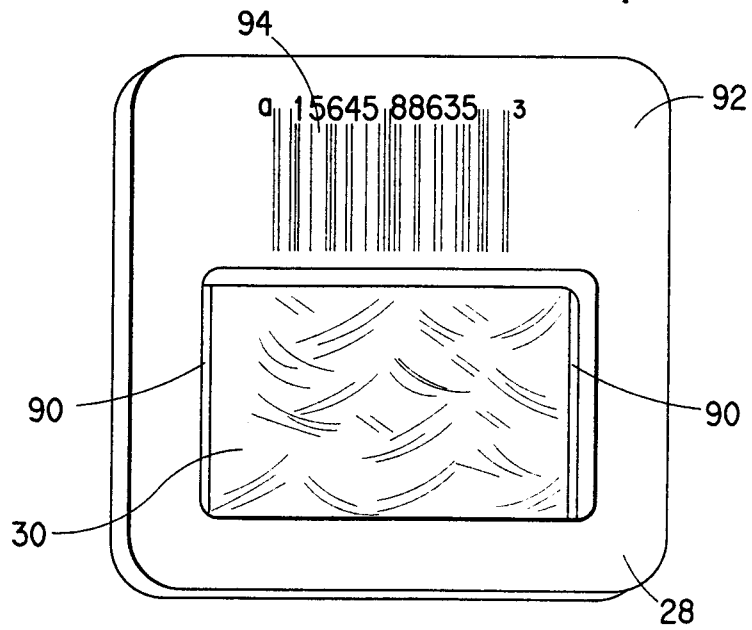


FIG. 2

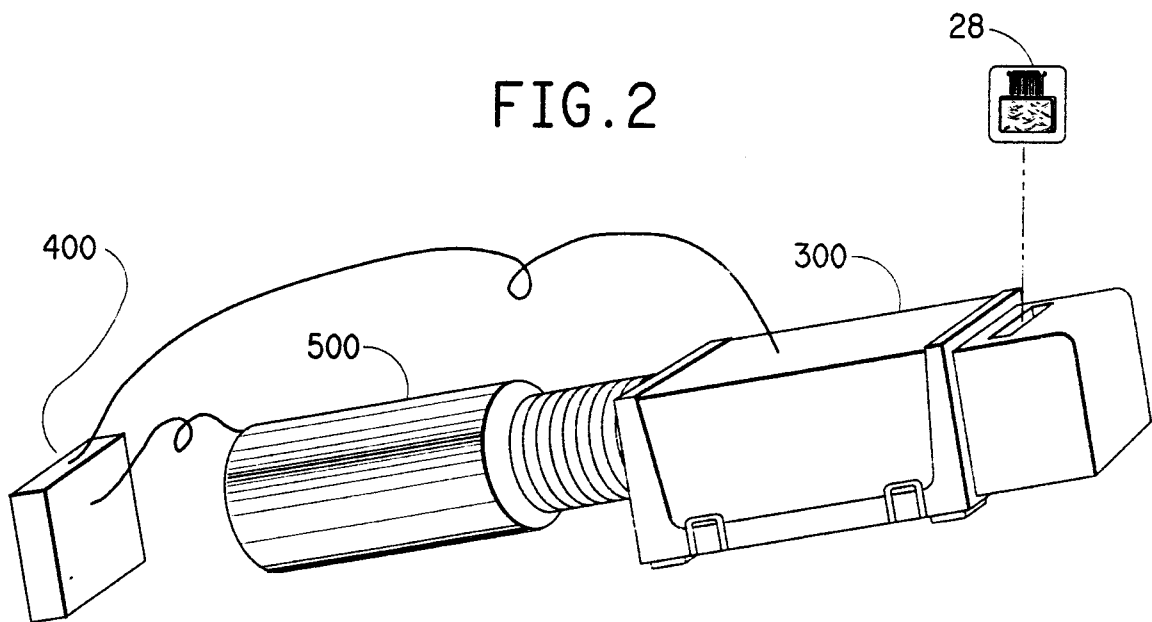


FIG. 3

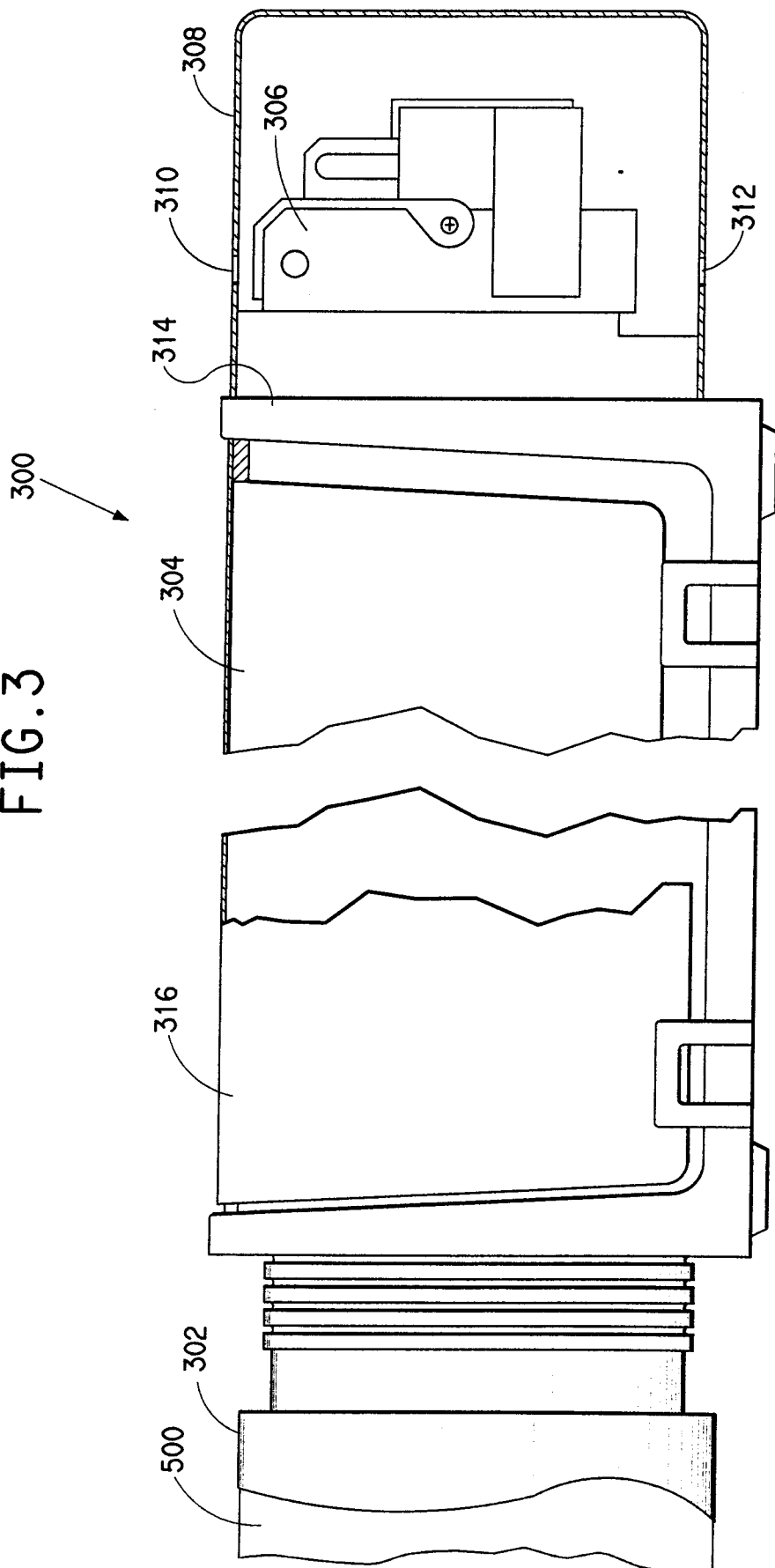
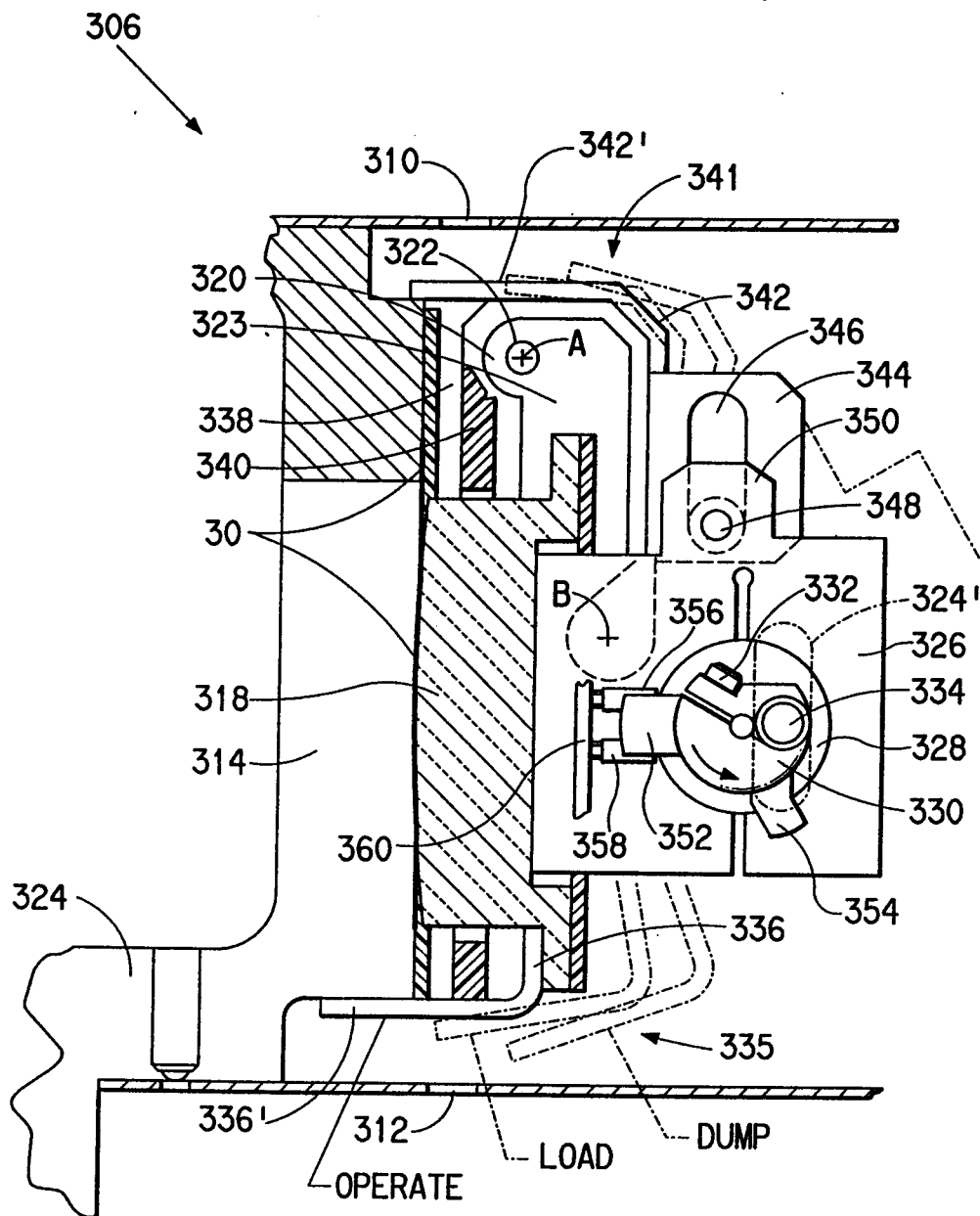


FIG. 4



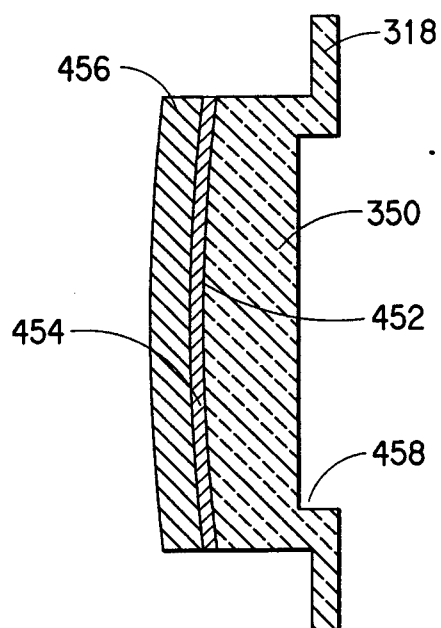


FIG. 5

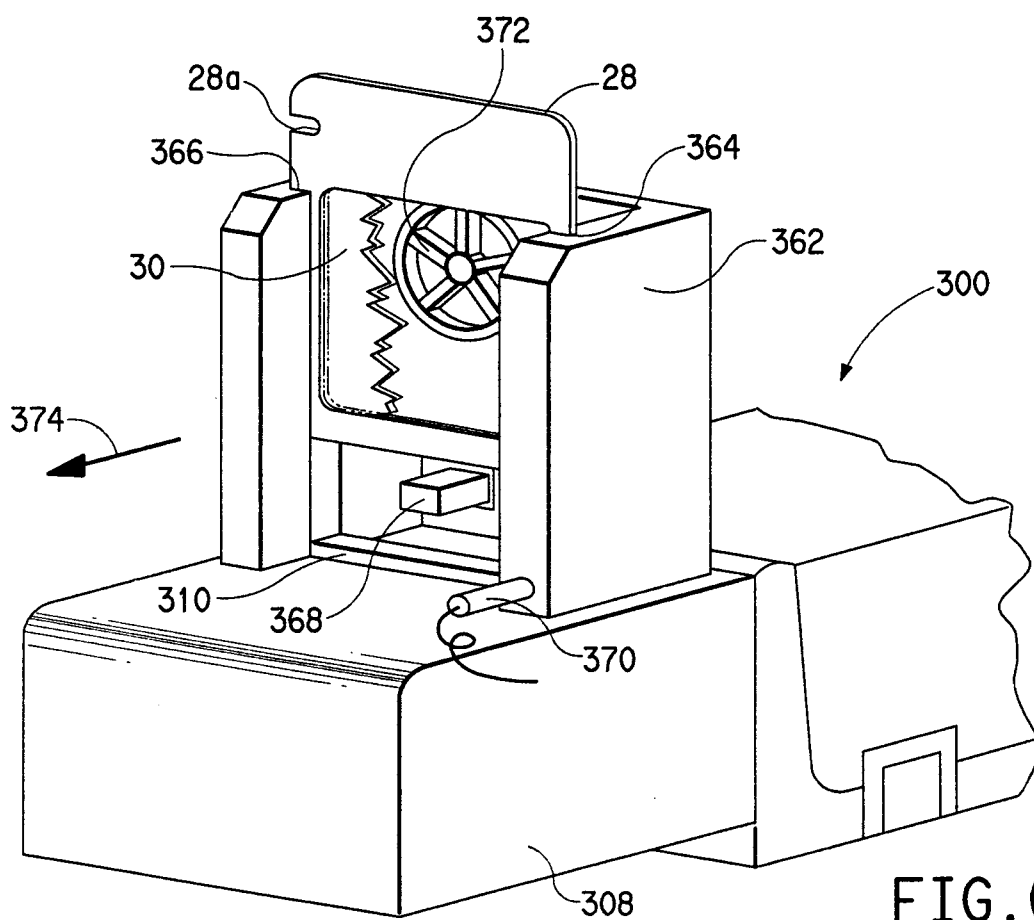


FIG. 6