

(19)



(10) **LT IP860 A**

(12) **PARAIŠKOS APRAŠYMAS**

(21) Paraiškos numeris: **IP860**

(51) Int. Cl. (2006): **C12Q 1/00**

(22) Paraiškos padavimo data: **1993 08 16**

C12Q 1/42

(41) Paraiškos paskelbimo data: **1995 03 27**

C12Q 1/68

G01N 21/76

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

G01N 33/533

G01N 33/535

G01N 33/58

(86) Tarptautinės paraiškos numeris: —

(86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: —

(85) Nacionalinio PCT lygio procedūros pradžios data: —

(30) Prioritetas: **738408, 1991 07 31, US**
5011246, 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

(74) Patentinis patikėtinis/atstovas:

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

(54) Pavadinimas:

**Fermentais paveiktų 1,2-dioksietanų chemiliuminescencijos sustirninimo būdas
ir šio būdo pritaikymas**

(57) Referatas:

—

TIK⁵ G 01 N 21/76
G 01 N 1 /00

FERMENTAIS PAVEIKTŲ 1,2-DIOKSETANŲ CHEMILUMINESCENCIJOS
SUSTIPRINIMO BŪDAS IR ŠIO BŪDO PRITAIKYMAS

Šis išradimas yra skirtas chemiluminescencijos signalų, generuotų fermentais apdorojant kai kuriuos pakeistus 1,2-diooksetanus, sustiprinimo būdui. Kalbant konkrečiau, išradimas yra skirtas vien tik membranų ar kitų hidrofobinių kietafazių pagrindų, kuriuose yra detektuojamas pavyzdys ir kurie gauti chemiluminescencijos aktyvumui nustatyti, džiovinimui arba jų džiovinimui, derinant kartu su šildymu, dėl to sustiprėja chemiluminescencijos intensyvumas.

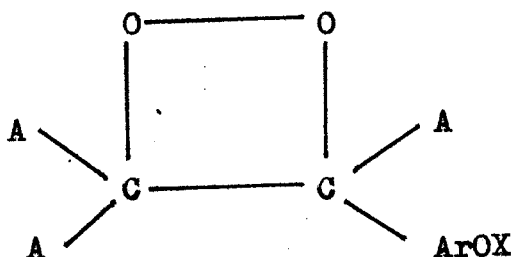
Chemiluminescenciniais junginiais vadinami tokie junginiai, kurie, vykstant cheminei reakcijai, įgauna savybę išspinduliuoti šviesos energiją. Ši savybė yra vadinama chemiluminescencija. Tokiose reakcijose cheminės sąveikos produktas, esantis elektronų sužadintoje būsenoje, spinduliuodamas gali pereiti į pagrindinę būseną, išsiskiriant spindulinei energijai. Fermentais paveiktų dioksetanų chemiluminescenciją galima panaudoti, pavyzdžiui, imunoanalizės srityje. Jeigu reakcija vykdoma tirpale, liuminescencija tęsiasi maždaug 1-2 minutes. Tuo atveju, kai nurodyta reakcija vykdoma kartu su pavyzdžiu, imobilizuotu į membraną ar kokią kitą kietafazį nešėją, dioksetano

VALSTYBINIS PATENTAS

tarpinis produktas, kuris sąlygoja liuminescenciją, tampa stabilesniu ir spinduliuoja šviesos energiją iki kelių dienų.

Iš visos eilės literatūros šaltinių yra žinoma apie tai, kad chemiliuminescencinius signalus galima gauti inicijuojant fermentais kai kuriuos pakeistus 1,2-dioksetanus. Nurodytuose šaltiniuose bendrais bruožais aprašomas chemiliuminescencinių signalų generavimo ir panaudojimo būdas, fermentais skaidant pakeisto 1,2-dioksetano judriąją grupę. Pašalinus fermentu hidrolizuotą grupę, gaunamas anijoninis pusproduktis, kuris vėliau skyla, trūkstant dioksetano žiedui. Dėl to bent vienas iš galutinių karbonilinių junginių yra fluorescencinis.

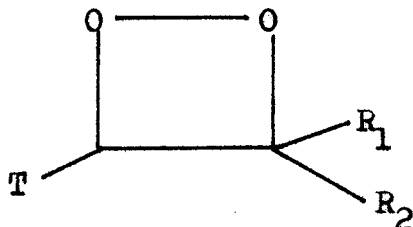
JAV patente Nr. 4857652 aprašyti liuminescenciniai 1,2-dioksetanai, kurių bendra formulė



kur ArOX - aromatinis žiedas, pakeistas oksigrupe X, o A - inertinė organinė grupė, kurios dėka 1,2-dioksetanas, inicijuojamas pašalinant radikala X, liuminescuoja. X yra chemiškai judri grupė, kuri pašalinama panaudojant aktyvatorių. 1,2-Dioksetano darinių liuminescencijos inicijavimą galima atlikti kambario temperatūroje.

JAV patente Nr. 4952707 pateiktas bendras 1,2-dioksetanų skaidymo fermentais aprašymas. Minėtame patente aprašyti fer-

mentais skaidomi chemiliuminescenciniai 1,2-dioksetanai, kurių bendra formulė:



kur R_1 - vandenilis arba cheminė jungtis, jeigu R_2 yra pakaitas, sujungtas su dioksetano žiedu spiro jungtimi, arba yra organinis pakaitas, neturintis įtakos šviesos spinduliavimui; R_2 - fluoro-foro liekana su kondensuotais žiedais, kurios žiede yra fermentais skaidoma judri keičiama grupė; T - stabilizuojanti grupė, kuri stabdo dioksetano tipo junginio dekompoziciją prieš nutrūsktant žiede esančios fermentais skaidomos judrios grupės jungčiai.

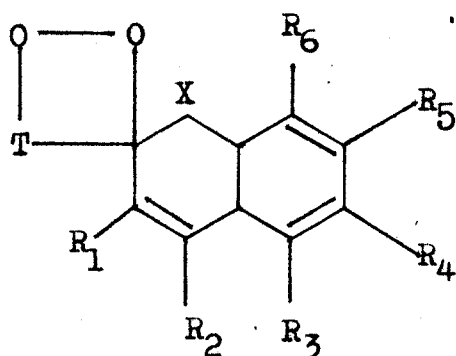
JAV patente Nr. 4956477 Bronstein ir kt. aprašo fermentais skaidomų 1,2-dioksetanų, naudojamų imunochemiliuminescencinėje analizėje, tyrimuose DNR-zondo metodu bei tiesioginiuose enzimo-testuose, sintezę.

JAV patente Nr. 4959182 aprašomas 1,2-dioksetanų chemiliuminescencijos sustiprinimo metodas bei mišinio sudėtis. Remiantis šiuo metodu, fermentais skaidomas 1,2-dioksetanas sumaišomas su paviršiaus aktyvia medžiaga (PAM), o fluorescencinis darinys jungiamas su angliavandeniliu, susidarant co-PAM micelinėse ir kitose struktūrose. Minėtas metodas užtikrina fermentais inicijuojamos 1,2-dioksetanų chemiliuminescencijos tirpale signalų sustiprinimą 500 kartų. Be to, Bronstein ir kt. (J. Biolumin. Chemilumin., 4 leidimas, p. 99-111, 1989 m.) praneša apie tai,

kad jaučio seruminis albuminas ir kitos vandenyje tirpios makromolekulės žymiai sustiprina tirpale fermentais skaidomų 1,2-dioksetanų chemiliuminescencinį signalą. Bet kuris iš minėtų stiprinimo agentų, kaip manoma, padidina anijoninio tarpinio produkto ir šviesą spinduliuojančių medžiagų stabilumą, laikant jas hidrofobinėje terpėje. Tačiau, esant hidrofobiniam nešėjui, pavyzdžiui, neiloninei membranai, hidrofobiškumą pasiekia tik anijonogeninės PAM. Tokiu būdu, naudojant šiuos stiprinimo agentus, jokio esminio sustiprinimo neįvyksta, jeigu fermentas imobilizuotas ant hidrofobinio nešėjo.

Australijos paraiškoje patentui A3640/89 Okada ir kt. aprašo fermentais inicijuotų 1,2-dioksetanų chemiliuminescencinių signalų sustiprinimo metodą. Fermentinė reakcija vykdoma esant optimaliai fermentui pH reikšmei. Po to, pridėdant stiprios bazės, pH padidinama tam, kad sustiprinti liuminescencinį efektą. Yra žinoma, kad tyrimuose, atliekamuose ant polistirolo karolių, chemiliuminescencinis signalas sustiprėja 7-59 kartus. Šis būdas neužtikrina tokio ryškaus signalo sustiprinimo, kokį pasiekia čia aprašytu būdu, t.y. džiovinant ir kartu šildant nešėją pavyzdžių detektavimo metu, o be to, dirbant minėtu būdu, reikia naudoti šarminį reagentą, tokį kaip 1 N NaOH.

Paraiškoje PCT 89/06650 Bronstein ir kt. nagrinėja galimybę panaudoti dioksetanus kiekybinėje analizėje, tame tarpe ir fluorescuojantį dioksetano chromoforą su spiro jungtimi ties 4 anglies atomu. Šio dioksetano darinio bendra formulė:



(I)

kur X - grupė CR_7R_8 , O, S arba jungtis R-R (kur kiekvienas radikalas R_7 , R_8 ir R, nepriklausomai vienas nuo kito, yra H, alkilas, heteroalkilas, arilas, heteroarilas, cikloalkilas, cikloheteroarilas, aralkilas, alkarilas arba fermentu hidrolizuojama grupė). Kiekvienas iš radikalų R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , nepriklausomai vienas nuo kito, yra H, elektronų akceptorinė grupė, elektronų donorinė grupė arba fermentais hidrolizuojama grupė, arba R_1 - R_6 kartu sudaro žiedą. T - pakeistas arba nepakeistas arilas, poliarilas, dioksetano cikloalkilidenas arba policikloalkilidenas su spiro jungtimi ties 3 anglies atomu. Nurodyti dioksetano dariniai naudojami analizėje, nustatant specifiškai sujungtos poros narį arba fermentą.

JAV patente Nr. 4705847 Hummelen ir kt. aprašo pakeistų policikloalkilidenpolicikloalkanų, pavyzdžiui, pakeistų adaman-tilidenadamantanų bei atitinkamų epidioksi-junginių, gavimo būdą. Policikloalkilidenpolicikloalkanus halogenina, o po to halogenintas produktas gali būti substituojamas. Vėliau gauti produktai paverčiami atitinkamais epidioksi-junginiais. Yra žinoma daug epidioksi-junginių su dioksetano žiedu. Šiuos junginius naudoja kaip termoluminescencinius markerius.

1,2-Dioksetanų kaip ženklinimo priemonės panaudojimą termoluminescencinėje imunoanalizėje aprašo J.C.Hummelen ir kt. žurnale "Methods in Enzymology", 133 tomas, p. 531-557, 1986 m. Kaitinant 1,2-dioksetanus, jie skyla į du karbonilinius fragmentus. Gauna minėtų fragmentų frakciją elektronų sužadintoje būsenoje, kuri, pereidama į pagrindinę būseną, išskiria spindulinę energiją. Kietafazės termoluminescencijos atveju vieną iš sujungimo partnerių paženkлина 1,2-dioksetano pagalba. Po to, kai ši ženklinimo priemonė susijungia su imobilizuotu partneriu, pagrindą pakaitina iki 150-250°C ir gauna chemiluminescencijos signalą.

Pagrindinis skirtumas tarp čia paminėto ir siūlomo metodų yra tas, kad šiame išradime naudoja fermentais inicijuojamus 1,2-dioksetanus. Fermentas yra naudojamas markeriu, o dioksetanas - pagrindu. Fermentinės reakcijos metu susidaranti tarpinė produktą inicijuoja kaitinant, tuo pačiu garantuodami ir chemiluminescencijos sustiprinimą. Siūlomas būdas iš esmės yra analizės kombinacija, panaudojant fermentais inicijuojamą chemiluminescenciją ir termochemiluminescenciją. Šis būdas pasižymi dviem pagrindiniais privalumais. Pirmiausia, tokios analizės jautrumas yra žymiai didesnis dėl fermentinio sustiprinimo, t.y. enzimoreakciją galima vykdyti tol, kol susidarys reikalingas pusproduktis. Kitas privalumas yra tas, kad naudoja žemesnes temperatūras dėl to, kad gautas pusproduktis nėra toks stabilus kaip termochemiluminescenciniai dioksetanai, naudojami kaip ženklinimo priemonės. Minėtam pusprodukčiui nebūtinai didelis stabilumas, kadangi jis betarpiškai susidaro cheminės reakcijos metu.

JAV patente Nr. 4948975 Erwin ir kt. aprašo liuminescen-

cinę atspindžio sistemą su įrenginiu, skirtu matuoti žemų lygmenų šviesos spinduliavimą, atsirandantį dėl liuminescencijos reakcijų elektromagnetiniuose laukuose, pavyzdžiui, esant superaukšto dažnio spinduliavimui, ir minėto įrenginio panaudojimą chemiliuminescencinės analizės bei šiluminės mikrodozimetrijos srityje. Superaukšto dažnio radiacijos poveikis chemiliuminescencijai aprašytas minėtame patente bei straipsnyje (žr. Kiel, Bioelectromagnetics, 4 leidimas, p. 193-204, 1983 m.) žymiai skiriasi nuo to efekto, kuris pateikiamas šiame aprašyme. Aprašomą sistemą sudaro fermentinės reakcijos, tokios kaip peroksidaziniais fermentais katalizuojamas liuminolo oksidavimas baltyminiuose geliuose, kurie yra drėgni, nes yra tirpale. Stiprinimą, kuriį garantuoja superaukšto dažnio spinduliavimas, lemia substrato (vandenilio peroksido) judrumo padidėjimas čia paminėto gelio viduje, bet ne faktiškas chemiliuminescencijos sustiprėjimas, kaip kad remiantis šiuo siūlomu būdu.

Šiuose ir kituose priešpastatytuose literatūros šaltiniuose bendrais bruožais aprašyti chemiliuminescenciniai procesai, tame tarpe ir dioksetanų. Tačiau nei viename iš nurodytų priešpastatytų literatūros šaltinių neišnagrinėtas chemiliuminescencinio signalo, gauto iš fermentais inicijuotų 1,2-dioksetanų ant kietafazio pagrindo, džiovinant šį pagrindą, arba džiovinant jį kombinacijoje su šildymu, stiprinimo būdas.

Tokiu būdu, šio išradimo tikslas yra sukurti chemiliuminescencinio signalo, kuriį generuoja fermentais inicijuoti 1,2-dioksetanai, sustiprinimo būdą. Dar vienas šio išradimo tikslas - chemiliuminescencinio signalo intensyvumo sustiprinimo kietafazėje analizėse per trumpesnį laiką ir nenaudojant daug darbo rei-

kalaujančių operacijų ar įrengimų būdas. Šio išradimo ypatybė yra ta, kad chemiliuminescencinis signalas, gautas iš fermentais inicijuojamų 1,2-dioksetanų, sustiprinamas 4-6 kartus, panaudojant šiame išradime aprašytus džiovinimo metodus (ir 100 kartų, jeigu papildomai panaudoti šildymo stadiją), lyginant su signalo, gauto panaudojant tradicinius metodus, galingumu, kai naudoja šlapia, substrato tirpale laikomą membraną. Čia siūlomo metodo privalumas yra tas, kad jis pasižymi panaudojimo universalumu, tame tarpe ir atliekant kietafazės analizes, tokias kaip, pavyzdžiui, imunosorbentinė analizė su fermentine žyme (ELISA) ir tyrimai DNR-zondų pagalba. Be to, toks sustiprinimas yra tinkamas baltymų ir nukleino rūgščių vaizdo fragmentų (blotų) gavimui fotokameros pagalba, o siūlomo išradimo skiriamieji požymiai yra tie, kad egzistuoja galimybė greitai užfiksuoti gero ryškumo vaizdą, pašalinant tokius trūkumus, kaip kad kameros šaldymas ir triukšmų fono lygis.

Šie bei kiti šio išradimo tikslai, požymiai bei privalumai bus aiškesni ir labiau suprantami, perskaičius toliau pateikiamą aprašymą.

Šis išradimas yra skirtas fermentais inicijuojamų 1,2-dioksetanų chemiliuminescencijos sustiprinimui, esant galimybei detektuoti pavyzdžio viduje. Minėto būdo esmė yra ta, kad:

a) gauna kietafazę pagrindą su ant jo esančiu tiriamuoju pavyzdžiu; šis pagrindas yra atitinkamai apdorotas tirpalu, kuriame yra fermentu inicijuojami 1,2-dioksetanai;

b) džiovina minėtą kietą pagrindą; ir

c) esant reikalui, šildo minėtą kietafazį pagrindą džiovinimo procese arba po džiovinimo;

be to, minėtą pagrindą džiovinimą ir/arba šildymą atlieka prieš arba kartu su chemiliuminescencinio signalo detektavimu.

Čia pateikiamas išradimas charakterizuojamas kietafazio pagrindo džiovinimo ir šildymo poveikiu chemiliuminescencinei charakteristikai. Svarbiu išradimo aspektu yra tai, kad, naudojant džiovinimą kombinacijoje su šildymu, garantuojamos geresnės stiprinimo charakteristikos, negu kad vien tik džiovinant. Šildymas duoda teigiamą efektą tik sausos membranos atveju arba kai ji džiovinama kartu su šildymu. Kaitinant šlapia membraną, laikomą hermetiškai įpakuota maišelyje, užpildytame substrato tirpalu, gaunamas kur kas silpnesnis signalas.

Membranos džiovinimas prieš detektavimą, nepriklausomai nuo naudojamo metodo, sustiprina signalą 4-6 kartus. Džiovinimo metodas, šildant džiovinimo spintoje, garantuoja stabiliausius rezultatus, tačiau analogiškas efektas gaunamas ir džiovinant vakuume, džiovinant oru ar džiovinant šildymo lempos pagalba. Papildomas šildymo efektas pasireiškia tuo atveju, kai membrana yra šildoma vaizdo fiksavimo metu, pavyzdžiui, naudojant kamerą prietaisuose su krūviniu ryšiu, t.y. minėtą membraną šildo fotografavimo metu. Sausą arba šlapia membraną galima šildyti vaizdo fiksavimo metu, kadangi šildant ji džiūsta labai greitai, betarpiškai ant plokštelės. Minėtų operacijų panaudojimas yra nauja koncepcija fermentais inicijuojamoje chemiliuminescencijoje. Stebimas sustiprinimas yra gaunamas, panaudojant karbonatinį

buferį. Žymiai silpnesnius signalus gauna tuo atveju, kai šarminės fosfatazės nustatymo testuose buferiu tiriamam pavyzdžiui panaudoja vieną iš šių standartinių buferių, tokių kaip, pavyzdžiui, Tris-buferis, dietanolaminas ir 2-amino-2-metil-1-propanolis.

Priešingai, kitame šios srities darbe daroma prielaida apie tai, kad fermentinėje reakcijoje naudojamų komponentų džiovinimas ir šildymas neigiamai veikia chemiliuminescencines savybes. Paskelbtuose protokoluose dėl substratų, kurių pagrindas - fermentais sustiprinti 1,2-dioksetanai, panaudojimą DNR analizei ant membranų faktiškai kalbama apie tai, kad negalima džiovinti minėtos membranos iki detektavimo stadijos arba šios stadijos metu (Tropix Southern-Light (tm) Protocol). Be to, rekomenduojamas metodas papildomai reikalauja, kad detektavimui skirta drėgna membrana po inkubacijos substrato tirpale būtų hermetiškai įpakuota plastikiniame maišelyje (Tropix Southern-Light (tm) Protocol) arba plastikiniame pakete (BRL Photo-Gene (tm) Instruction Manual).

Šiame išradime pateikta keletas džiovinimo kombinacijų, šildant arba nešildant po džiovinimo tiriamą pavyzdį. Kiekvieną čia siūlomo išradimo metodo modifikaciją reikia nagrinėti priklausomai nuo konkretaus tyrinėtojo poreikio. Pavyzdžiui, tiriamo pavyzdžio džiovinimas prieš detektavimą, o ne jo šildymas nustatymo procese, o taip pat ir vienu metu atliekamas tiriamo pavyzdžio džiovinimas-šildymas jo detektavimo metu yra geriausi metodai praktiniu požiūriu. Kai kuriais atvejais, kai tiriamo pavyzdžio šildymas jo detektavimo metu yra netikslingas, pavyzdžiui, jeigu naudoja rentgeno arba fotojuostą, geriausias yra tas metodas,

kai tiriamas pavyzdys yra džiovinamas ir šildomas prieš jo detektavimą.

Iš kitų tinkamų šildymo ir/arba džiovinimo kombinacijų (kartu ir jų ryšys su detektavimo stadija) galima pažymėti vien tik pavyzdžio džiovinimą (be tolesnio jo šildymo tuo pat po džiovinimo) prieš detektavimą; pavyzdžio džiovinimą su tolesniu jo šildymu, be to, abi šias operacijas atlieka prieš pavyzdžio detektavimą; vien tik pavyzdžio džiovinimą jo detektavimo metu (nors tai ir netikslinga dėl laiko sąnaudų ir neturi privalumų, kadangi membranai džiūstant, tam tikrame laiko intervale signalai nesikeičia); ir pavyzdžio džiovinimą bei šildymą kartu su jo detektavimu.

Kietafazio pagrindo su tiriamu pavyzdžiu "džiovinimą" reikia suprasti taip, kad iš nurodyto pavyzdžio yra pašalinti tirpiklio ar kokio kito vandeninio tirpalo likučiai. Nekeliant tikslo susieti su kokia nors konkrečia teorija, džiovinimo, remiantis čia sukurtu metodu, teigiamo efekto vienas iš galimų paaiškinimų būtų tas, kad pavyzdyje (paprastai membranoje) nėra tirpiklio molekulių, kurios gali susidurti su sužadintomis molekulėmis ir, tuo pačiu, yra mažesni energijos nuostoliai dėl jos išsisklaidymo susidūrimo metu, kas padidina kvantinę išeigą. Tirpiklio molekulės pašalina džiovinimo metodu, neleidžiančiu liuminescencijai užgsti dėl molekulių susidūrimo. Membranos džiovinimas prieš jos detektavimą padidina signalo stiprumą 4-6 kartus, lyginant su tradiciniais metodais, kai membrana laikoma šlapioje būsenoje, t.y. substrato tirpale. Tam, kad gauti pilną signalo sustiprinimo efektą, membrana turi būti visiškai sausa.

Kietafazio pagrindo džiovinimą, remiantis šiuo išradimu, atlieka tam tikrame laiko ir temperatūros režime, be to, temperatūros reikšmę parenka taip, kad ji atitiktų vakuuminio, konvekcinio, natūralaus džiovinimo režimą ar džiovinimo, panaudojant superaukštą dažnį ir elektros energiją, režimą. Pavyzdžiui, džiovinant vakuume maždaug 15-30 min., pakanka aplinkos temperatūros. Konvekcinis džiovinimas (panaudojant, pavyzdžiui, tradicines džiovyklas) vykdomas maždaug 5-30 min. 30-100°C temperatūroje. Džiovinimas oru vykdomas 30 min. ar ilgiau (keletą valandų) aplinkos temperatūroje. Džiovinimo režimas priklauso nuo visos eilės parametrų, pavyzdžiui, membranos išmatavimų, jos sudėties bei pradinio drėgmės kiekio membranoje. Džiovinimo režimui reikalinga optimizacija kiekvieno panaudojimo atveju. Nustatytas šiame išradime režimas parengtas neiloninėms 8 x 8 cm dydžio ir mažesnėms membranoms, kurios, prieš jas džiovinant, buvo blokuojamos, siekiant pašalinti iš jų tirpalo perteklių.

Tam, kad išdžiovinti minėtą membraną, pasirenka patogiausią džiovinimo metodą. Vienintelis reikalavimas yra tik tas, kad membranos būtų gerai išdžiovintos. Pirmenybė teikiama šlapių arba jau iš anksto kiek padžiovintų membranų elektrinio šildymo metodui, detektuojant tiriamą pavyzdį kamera prietaisuose su krūviniu ryšiu. Optimalus režimas priklauso nuo panaudojimo. Kai kuriais atvejais būtų pageidautina gauti patį intensyviausią signalą per kuo trumpesnę laiko intervalą. Tam būtina panaudoti aukštesnę temperatūrą, pavyzdžiui, 100°C. Būtų pageidautina garantuoti ilgesnę emisiją, panaudojant žemesnę temperatūrą, pavyzdžiui, 70-80°C, kad būtų galima pasiekti daugkartinį įvairaus ilgio eksponavimą. Šiuo atveju padidintos koncentracijos takeliai

skaitomi esant trumpesnei ekspozicijai, o tuo tarpu sumažintos koncentracijos takeliai skaitomi esant ilgesnei ekspozicijai. Šis metodas padidina sistemos dinaminį diapazoną.

Tiriamą pavyzdžio "šildymą" reikia suprasti taip, kad pašalinus tirpalą iš nurodyto pavyzdžio, šis toliau veikiamas šiluma ar kokia kita energija, siekiant padidinti jo temperatūrą. Ir vėl, nekeliant tikslo susieti su kokia nors konkrečia teorija, šildymo, remiantis čia sukurtu metodu, teigiamo efekto vienas iš galimų paaiškinimų būtų tas, kad minėtas šildymas, tikriausiai, greičiau ir/arba žymiai pilniau suskaido tarpinio reakcijos produkto molekules, kas sąlygoja kur kas intensyvesnį signalo sukaupimą per žymiai trumpesnį laiko intervalą, lyginant su tradiciniais metodais, kuriuose šildymo nenaudoja. Remiantis šiuo išradimu, kietafazio pagrindo šildymas vykdomas apibrėžtą laiką ir apibrėžtoje temperatūroje pagal bet kurią iš daugybės metodų, tokių kaip, pavyzdžiui, elektrošildymas, radiacinis šildymas IR-spinduliais (pavyzdžiui, kaitinimo lempa), konvekcinis šildymas ir šildymas superaukštu dažniu. Naudojant standartinius metodus kombinacijoje su šildymu superaukštu dažniu, membranos džiovinimą būtina vykdyti termostate arba konvekciniame džiovykloje 30°C temperatūroje 30-45 min. bėgyje. Po džiovinimo, membraną įdeda į tradicinę superaukšto dažnio krosnį 20-30 sekundžių. Galima naudoti taip pat ir kitus, toliau aprašomus džiovinimo ir/arba šildymo būdus.

Jeigu detekcijos metu tiriamą pavyzdį šildo elektra, panaudojant iš anksto išdžiovintą membraną, tai šią membraną prieš tai džiovina konvekciniame džiovykloje 10-30 min. 40°C temperatūroje. Po to membraną deda ant kaitinamos elektra plokštės ir

šildo 40-100°C temperatūroje maždaug nuo 30 sek. iki 10 min., kartu fiksuodami signalą kamera prietaisuose su krūvinio ryšiu. Atlieka seriją tiriamo pavyzdžio vaizdo fotografavimų, išlaikymas paprastai būna nuo 30 sek. iki 2 min., ir po to atrenka tuos vaizdus, kuriuose yra geriausias signalo ir fono santykis.

Kaitinimo lempą galima naudoti membranų šildymui-džiovinimui prieš detektavimą. Šlapią membraną deda ant blotavimui skirtą popieriaus lapą ir 5-20 min. džiovinama po kaitinimo lempą (375 W). Detektavimą atlieka naudodami rentgeno juostą arba kamerą prietaisuose su krūvinio ryšiu.

Atliekant detektavimo procese džiovinimą kartu su šildymu, šlapią membraną deda ant elektra kaitinamos plokštės, veikiant kamerai prietaisuose su krūvinio ryšiu. Membraną džiovinama, šildant 40-100°C temperatūroje nuo 30 sek. iki 10 min. Po to atlieka seriją tiriamo pavyzdžio vaizdo fotografavimų, išlaikymas paprastai būna nuo 30 sek. iki 2 min., ir atrenka tuos vaizdus, kuriuose yra geriausias signalo ir fono santykis.

Be to, kaip manoma, membranas galima šildyti detektavimo metu, naudojant superaukšto dažnio spinduliavimą, nors šis metodas nebuvo realizuotas.

Paprastai šildo 1-10 min. 40-100°C temperatūroje. Į šildymą galima žiūrėti dar ir kaip į vieną iš membranų džiovinimo metodų. Tačiau yra skirtumas tarp membranų džiovinimo iki analizės, nepriklausomai nuo panaudojamų priemonių, bei tiek šlapios, tiek ir sausos membranų šildymo detektavimo metu. Jeigu membrana signalo detektavimo metu nešildoma, tai pagrindinis stebimas efektas, kaip manoma, yra susijęs su džiovinimo efektu,

nepriklausomai nuo panaudojamo džiovinimo metodo. Šildymas signalo detektavimo metu duoda patį didžiausią jo stiprinimą.

Aišku, kad šiame aprašyme pateikti džiovinimo bei šildymo metodai specialistams bus suprantami, ir kad čia pateikti metodai yra iliustruojantys, bet ne apribojantys, ir kad šio išradimo, apibūdinamo pateikta jo apibrėžtimi, esmės bei apimtys rėmuose yra galimi ir kiti variantai.

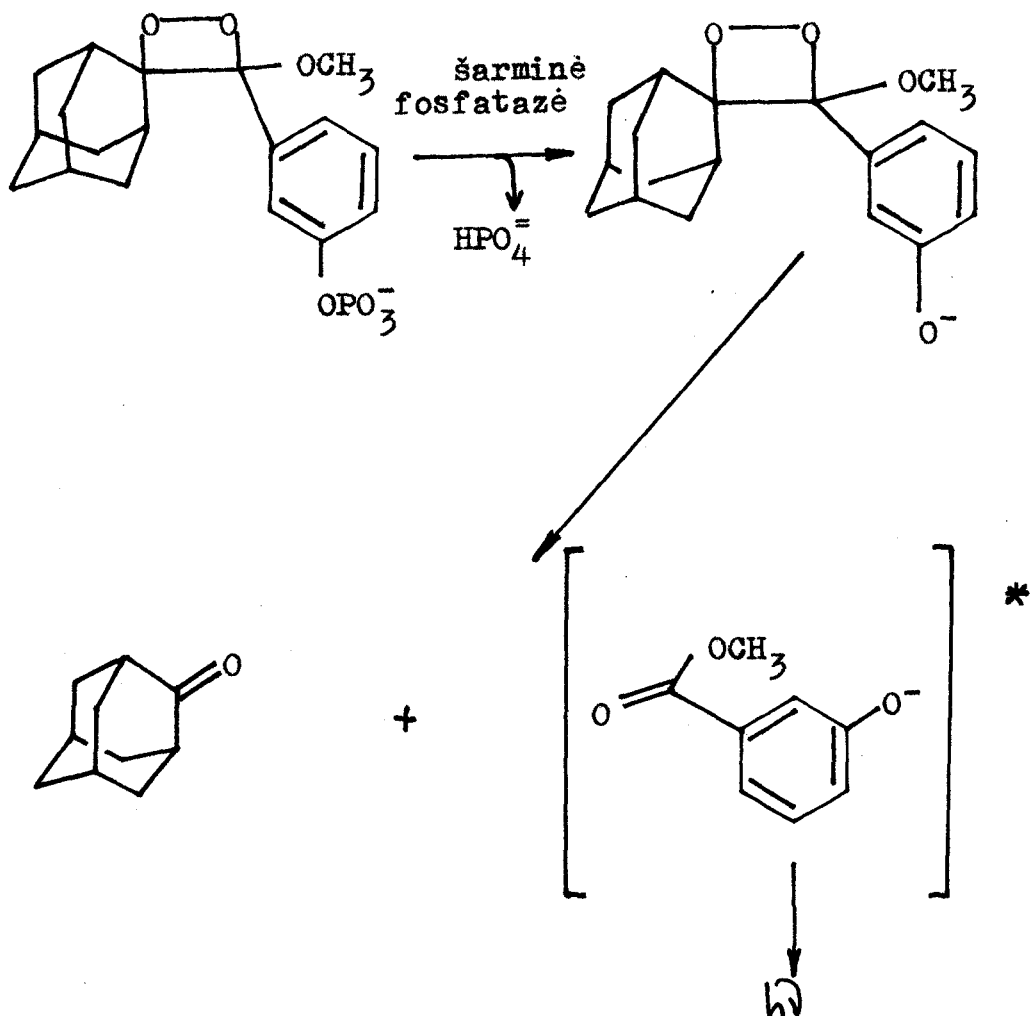
Aišku taip pat ir tai, kad įvairūs džiovinimo bei šildymo metodai, aprašyti šiame išradime, gali būti optimizuoti, siekiant patenkinti konkrečius tyrinėtojo poreikius.

Šiame išradime siūlomą sustiprinto chemiluminescencinio signalo aptikimo metodą galima panaudoti kietafazėje imunofermentinėje analizėje, kurioje naudoja substratus 1,2-dioksetanų pagrindu, sudarančius pusiaustabilius tarpinius produktus. Kadangi siūlomas metodas labiausiai tinka gerai žinomoms sistemoms chemiluminescuojančių 1,2-dioksetanų pagrindu, nuoroda padaryta į JAV patentus Nr. 4931223 ir Nr. 4952707, kurie įtraukti į šį aprašymą, siekiant parodyti technikos lygį. Taip pat yra ir daugybė publikacijų, kuriose aprašytas fermentais apdorotų (juos įpurškiant) 1,2-dioksetanų panaudojimas imunofermentinėje analizėje (Bronstein et al., J. Biolumin. Chemilumin., 4 leidimas, p. 99-111, 1989), Sauzern-blotinge (Bronstein et al., BioTechniques, 8 leidimas, p. 310-314, 1990) bei DNR sekvenavime (Tizard et al., Proc. Natl. Acad. Sci 87, pp 4514 - 4518, 1990).

Minėti analizės metodai remiasi tokia tarpusavio sąveika, kai viena molekulė specifiškai jungiasi su kita. Specifiškai jungiančioms poroms priskiriama: antikūnis-antigenas, papildomi

nukleino rūgščių siūlai, jungiantis baltymas-vitaminas ir jungiantis baltymas-nukleino rūgštis. Pirmąjį jungiančios poros komponentą atskiria ir imobilizuoja ant kieto pagrindo. Po to šį pagrindą inkubuoja tirpale, kuriame yra antrasis jungiančios poros komponentas, į kurią arba tiesiogiai yra įvesta fermentinė žymė, arba prie jo prikabinta jungiančioji grupė, pavyzdžiui, biotinas arba avidinas, kuri po to gali prijungti fermentinę žymę. Antruoju atveju pagrindą inkubuoja tirpale, kuriame yra fermentinė žymė. Po to šį pagrindą inkubuoja tirpale, kuriame yra substratas atitinkamo 1,2-dioksetano darinio pagrindu, naudojami fermentinei žymei. Pavyzdžiui, tuo atveju, kai fermentinė žyme naudoja šarminę fosfatazę, galima panaudoti 3-(2'-spiroadamantan)-4-metoksi-4-(3"-fosforiloksi)fenil-1,2-dioksetaną. 3-(2'-spiroadamantan)-4-metoksi-4-(3"-D- β -galaktopiranoziloksi-fenil)-1,2-dioksetaną galima panaudoti tuo atveju, jeigu fermentinė žyme yra β -D-galaktozidazė. Iš tradicinių kiekybinės analizės metodų galima paminėti kietafazę imunofermentinę analizę (ELISA), DNR-tipavimą ir Sauzern-blotingą.

Fermentinės reakcijos metu vyksta fermentu hidrolizuotos grupės pašalinimas iš 1,2-dioksetano, susidarant tarpiniam anijoniniam produktui. Minėto pusprodukčio pusinio gyvavimo laikas - keletas valandų, adsorbuojant jį hidrofobiniu pagrindu, pavyzdžiui, neilonine membrana. Minėtas pusproduktis suyra trūkstant dioksetano žiedui ir susidarant dviems karboniliniams junginiams. Bent vienas iš šių junginių yra elektronų sužadintoje būsenoje, dėl spindulinės energijos išsiskyrimo jis tampa neaktyviu. Kaip pavyzdys pateikiama ši reakcijų schema:



Džiovinimo ir neprivalomo šildymo operacijas atlieka ant kieto pagrindo po inkubacijos substrato tirpale, o chemiliuminescencinį signalą matuoja pagal anksčiau aprašytą metodiką. Pagrindo šildymas garantuoja papildomą chemiliuminescencinio signalo stiprinimą dėl, tikriausiai, tarpinio anijoninio skilimo inicijavimo.

Pirmenybė, panaudojant kietafazius pagrindus, teikiama hidrofobiniams pagrindams, tokiems kaip, pavyzdžiui, neiloninės membranos, polimeriniai karoliai ir titravimo mikroplanšetės, kur juos panaudoja analizėje konjugato atskyrimui nuo neprijung-

tos fermentinės žymės. Kietafazio pagrindo parinkimas priklauso nuo atliekamos kiekybinės analizės tipo. Imunoanalizėje paprastai naudoja polimerinius rutuliukus ir titravimo mikroplanšetes, nors galima panaudoti taip pat ir membranas. Membraną rekomenduojama naudoti bet kuriame kiekybinės analizės metode, kur elektroforezei reikalingas pernešimas iš gelio, t.y. atliekant blotinę pagal Sauzerną, Vesterną ir Nozerną. Dažniausiai naudojama kietafaziais pagrindais yra polimeriniai rutuliukai, titravimo mikroplanšetės ir membranos. Tačiau, tokiu pagrindu faktiškai galima naudoti bet kurią jo formą, pavyzdžiui, mėgintuvėlius ir lopetėles. Pirmenybė teikiama hidrofobinio pagrindo panaudojimui, kadangi jis garantuoja hidrofobinę terpę, kuri, kaip manoma, stabilizuoja anijoninį tarpinį 1,2-dioksetano produktą. Manoma (teoriškai), kad hidrofilinio pagrindo panaudojimo atveju stiprinimas turėtų būti žymiai silpnesnis, kadangi tarpinis produktas paprastai greičiau suskyla.

Remiantis šiuo išradimu, papildomai medžiagą rišančią komponentę imobilizuoja ant kieto pagrindo. Pavyzdžiui, jeigu taikins minėtame pagrinde yra DNR, tai naudoja papildomą DNR-zondą. Imunoanalizėje naudoja papildomą porą antikūnis-antigenas. Į kitą medžiagą rišančią komponentę galima betarpiškai įvesti fermentinę žymę, arba ją galima modifikuoti, įvedant antrą rišančią medžiagą, kuri po to fiksuoja fermentinę žymę. Čia siūlomoje sistemoje DNR-taikinį imobilizuoja membranoje. Rišančia komponente naudoja papildomą DNR-zondą, kuris modifikuotas taip, kad jame yra vitaminas-biotinas. Po hibridizacijos, kurios metu atkaitina papildomus DNR-siūlus, įveda šarminės fosfatazės ir avidino konjugatą. Avidinas yra rišantysis baltymas, pasižymintis

dideliu giminingumu biotinui. Tokiu būdu, dėl biotino-avidino komplekso susidarymo vyksta fermentinės žymės ir DNR-zondo susijungimas. Šarminę fosfatazę panaudoja tuo atveju, kai 1,2-dioksetanu yra 3-(2'-spiroadamantan)-4-metoksi-4-(3"-fosforiloksi)-fenil-1,2-dioksetanas (dažnai vadinamas AMPPD). Be to, jeigu 1,2-dioksetanu yra 3-(2'-spiroadamantan)-4-metoksi-4-(3"- β -D-galaktopiranozilfenil)-1,2-dioksetanas, tai tada naudoja β -D-galaktozidazę (dažnai vadinama AMPGI).

Chemiliuminescencinio signalo stiprumo matavimus atlieka pagal bet kurią iš daugybės metodų, lengvai suprantamų specialistams. Minėtus metodus varijuoja plačiame diapazone, priklausomai nuo tikslų, kuriems pasiekti gali būti taikomas siūlomas metodas. Pavyzdžiui, siūlomas detektuojamo signalo stiprinimo metodas gali būti tinkamas daugeliu atvejų, tame tarpe ir jautrumo kietafazėse analizėse, tokiose kaip, pavyzdžiui, kietafazė imunofermentinė analizė arba tyrimai DNR-zondų pagalba padidini-
mui. Iš kitų kiekybinės analizės tipų galima paminėti analizes pagal Sauzerno, Nozerno ir Vesterno metodą. Siūlomas stiprinimo metodas yra tinkamas baltymų ir nukleino rūgščių blotų (atspaudų) gavimui, kur paprastai naudoja rentgeno juostą. Pagrindinis siūlomo stiprinimo metodo privalumas yra tas, kad jo dėka žymiai sutrumpėja detektavimo procesui būtinas laikas, t.y. laikas, skirtas substrato inkubacijai kartu su chemiliuminescencinio signalo išaiškinimu. Detektavimo procedūrą, kuri paprastai trunka keletą valandų, galima atlikti per 10 min. ar netgi greičiau. Įrengimai, naudojami matavimo stadijoje, yra rentgeno arba fotojuosta bei papildomos priemonės, tokios kaip fotodaugintuvas ir elektroninis vaizdo signalų imtuvas (pavyzdžiui, telekamera

prietaisuose su krūvinio ryšiu). Ši aparatūra ne tik pasižymi savybe greitai užregistruoti vaizdo signalus, esant dideliame intensyvumui, bet ir neturi kitų konstrukcinių trūkumų, tokių kaip, pavyzdžiui, kameros šaldymas bei triukšmų fono lygis.

Šis išradimas bus dar aiškesnis, išstudijavus toliau pateikiamus pavyzdžius.

P a v y z d ž i a i

Bendra metodika

Membranos džiovinimo bendros metodikos, remiantis šiuo chemiliuminescencijos stiprinimo prieš detektavimą siūlomu išradimo metodu, esmė yra tokia. Pagrindas ruošiamas remiantis standartinė testavimo metodika, atsižvelgiant į atliekamos analizės tipą, pavyzdžiui, kietafazė imunofermentinė analizė, DNR-tipavimas ar analizė Sauzerno metodu. Remiantis šiais analizės metodais, fermentinę žymę sujungia su molekulėmis, imobilizuotomis ant kieto pagrindo, panaudojant fermentu ženklintą antikūnį, DNR-zondą arba fermentą, konjuguotą su biotinu arba avidinu. Po to minėtą kietafazę pagrindą inkubuoja fermentinei žyme skirtame tirpale, kuriame yra atitinkamas 1,2-dioksetano substratas. Inkubavimo laikas priklauso nuo analizuojamos medžiagos koncentracijos ir paprastai yra nuo 5 iki 30 min. Po to ant sugeriamojo popieriaus lapo atlieka pagrindo sausąjį blotinę ir džiovina konvekciniame džiovykloje 5-10 min. 60-100°C temperatūroje. Alternatyvinio varianto atveju pagrindą galima džiovinti vakuume 15-30 min. arba ore 30 min., veikiant po to 10-20 sek. superaukštu dažniu. Užbaigus džiovinimą, chemiliuminescencinis signalas matuojamas

atitinkamo detektoriaus pagalba, pavyzdžiui, panaudojant foto ar rentgeno juostą, fotodaugintuvą arba kamerą prietaisuose su krūvinio ryšiu. Vidutinis detektavimo laikas nevienodas ir priklauso nuo naudojamo detektoriaus, inkubacijos laiko bei tiriamos medžiagos koncentracijos. Naudojant rentgeno juostą, ekspozicijos laikas paprastai yra 1-5 min., o kameros prietaisuose su krūvinio ryšiu atveju ekspozicijos trukmė yra 1-10 min.

Membranos džiovinimo kartu su šildymu signalo detekcijos metu bendros stiprinimo metodikos, remiantis šiuo išradimu, esmė yra tokia. Po fermentu paženklintos molekulės imobilizavimo, pagrindą inkubuoja fermentinei žymei skirtame tirpale, kuriame yra atitinkamo 1,2-dioksetano substratas. Inkubavimo laikas priklauso nuo analizuojamos medžiagos koncentracijos ir paprastai yra nuo 1 iki 30 min. Po to ant blotingui skirtos sugeriamojo popieriaus atlieka pagrindo sausąjį blotingą ir deda ant kaitinimo elemento arba į džiovinimo kamerą, panaudojant detektorių, pavyzdžiui, fotodaugintuvą arba kamerą prietaisuose su krūvinio ryšiu. Alternatyvinio varijanto atveju pagrindą, prieš signalo sukaupimą, galima išdžiovinti. Bet kuriuo atveju pagrindą šildo signalo integravimo metu. Šildymo temperatūra nuo 40° iki 100°C. Prieš matuojant signalą, pagrindą šildo 0-10 min. Šią procedūrą paprastai vykdo atliekant seriją matavimų ir išrenkant matavimo rodiklį su pačiu geriausiu signalo-fono santykiu. Integravimo laikas priklauso nuo analizuojamos medžiagos koncentracijos, šildymo temperatūros ir inkubacijos laiko. Integravimo laikas paprastai yra nuo 30 sek. iki 5 min.

1 Pavyzdys

Biotinilinta DNR sustiprintos chemiliuminescencijos detektavimas ant neiloninės membranos, panaudojant kamerą prietaisuose su krūviniu ryšiu.

Biotinilintą DNR faga liambda (Vector Laboratories) praskiedžia 6 x SSC-buferiu (0,9 M natrio chlorido ir 0,09 M trinatrio citrato), kuriame yra veršelio timuso DNR (5 ng/mkl), ir gauna jos koncentracijas 50, 40, 30, 20, 10, 5 ir 1 pg/200 mkl. Po to, ant krūvio neturinčios neiloninės membranos (MSI) atlieka gautų tirpalų slot-blotingą, pridedant po 200 mkl kiekvieno praskiesto tirpalo į slot-blotingo įrenginio duobutes (Bio-Rad, Bio-Dot SF). Po to duobutes keletą kartų praplauna 6-kartiniu SSC-buferio kiekiu. Po to membraną džiovina 5 min. kaitinimo lempa ir siuva 2 min. bėgyje, veikiant UV-spinduliais ir panaudojant fotodinini UV-spindulių 450 modelio imtuvą (Fotodyne UV 450 Transilluminator).

Po to membraną 30 min. inkubuoja ^{125}I -blokavimo buferyje (Tropix), kuriame yra 0,2 % ^{125}I tirpalo fosfato buferio turinčiame fiziologiniame tirpale (PBS). Po to minėtą membraną 30 min. deda į tirpalą, kuriame yra avidino ir šarminės fosfatazės konjugatas (komercinis pavadinimas AvidinTM, firma Tropix) ^{125}I -blokuojančiame buferiniame tirpale (5 mkl dvidešimčiai ml). Po to membraną du kartus po 5 min. praplauna ^{125}I -blokuojančiu buferiu, o po to dar 4 kartus po 5 min. 0,3 % Twin-20 tirpalu, paruoštu PBS-buferyje. Po to membraną dar 4 kartus praplauna tiriamo pavyzdžio buferyje (0,05 M, pH 9,5, karbonatinis buferis, kuriame yra 1 mM magnio chlorido).

Po to minėtą membraną 5 min. inkubuoja 0,25 mM tirpale, kuriame yra AMPPD-substratas (firma Tropix), paruoštas tiriamam pavyzdžiui skirtame buferyje. Minėtą membraną ištraukia iš substrato tirpalo, ant blotingui skirto popieriaus lapo atlieka blotinę tam, kad pašalinti tirpalo perteklių, o po to deda ant elektra kaitinamo elemento, kurio temperatūra 70°C, veikiant kamerai prietaisuose su krūviniu ryšiu (modelis Star-1, firma Photometrics, LTD). Po to atlieka 2 min. trukmės eksponavimų seriją, kas leidžia užfiksuoti chemiluminescencinį signalą šildymo procese. Pralaidumo juostų intensyvumą antriniame vaizde nustato kompiuterine analize. Gauti rezultatai pateikti 1 lentelėje.

1 Lentelė

Chemiluminescencinės biotinilintos DNR savybės ant neiloninės membranos, detektuojant kamera prietaisuose su krūviniu ryšiu

<u>Ivedamas DNR kiekis</u>	<u>Intensyvumas (santykiniai šviesos vienetai)</u>
30	88,4
20	74,9
10	37,2

1 Palyginimo pavyzdys

Biotinilintos DNR standartinė chemiluminescencinė analizė ant neiloninės membranos, panaudojant kamerą prietaisuose su krūviniu ryšiu.

Slot-blotting membraną gauna ir apdoroja remiantis metodika, aprašyta 1 pavyzdyje. Po inkubavimo 15 min. bėgyje AMPPD-substrato tirpale, minėtą membraną hermetiškai pakuoja į plastikinį maišelį ir inkubuoja dar 15 min. Šis maišelis dedamas po kamera prietaisuose su krūvinio ryšiu ir eksponuojama 5 min. Juostų intensyvumą nustato remiantis metodika, aprašyta 1 pavyzdyje. Šių kontrolinių tyrimų, atliktų kelių dienų bėgyje, rezultatai pateikti 2 lentelėje.

2 Lentelė

Biotinilintos DNR standartinė chemiliuminescencinė analizė ant neiloninės membranos, panaudojant tradicinį detektavimo metodą kamera prietaisuose su krūvinio ryšiu

DNR kiekis (pg)	Intensyvumas (santykiniai šviesos vienetai)
40	0,755
30	0,558
20	0,331
10	nenustatoma

Kaip seka iš 1 ir 2 lentelėse pateiktų palyginamosios analizės duomenų, chemiliuminescencijos stiprinimo metodas, džiovinant ir kartu šildant detektavimo metu, garantuoja 100-kartinį chemiliuminescencijos intensyvumo padidėjimą, žymiai sutrumpėjant laikui, kuris reikalingas inkubavimui ir ekspozicijai. Detektavimą su stiprinimu atlieka esant 15 min. trukmės pagrindo inkubavimui ir 2 min. trukmės eksponavimui, tuo tarpu kai įprasto detektavimo metu naudoja 30 min. trukmės pagrindo inkubavimą ir 5 min. trukmės ekspoziciją.

2 Pavyzdys

Biotinilintos DNR sustiprintos chemiliuminescencijos de-
tektavimas ant neiloninės membranos, panaudojant rentgeno juostą

Slot-blotting membraną gauna ir apdoroja remiantis metodika,
aprašyta 1 pavyzdyje. Po inkubavimo 5 min. bėgyje AMPPD-subs-
trato tirpale, ant blotingui skirtos sugeriamojo popieriaus lapo
atlieka minėtos membranos "sausą" blotingą, po to perkelia ant
naujo blotingui skirtos popieriaus lapo ir džioviną džiovinimo
spintoje hibridizacijai 5 min. 60° C temperatūroje. Po to mem-
braną išima iš džiovinimo spintos ir eksponuoja 5 min., naudo-
dami rentgeno juostą (firma Kodak XAR). Rentgenogramą įveda į
kompiuterį analizei, panaudojant Cohu kamerą. Gauti rezultatai
pateikti 3 lentelėje.

3 Lentelė

Biotinilintos DNR chemiliuminescencinio spinduliavimo ant
neiloninės membranos intensyvumas, panaudojant sustiprintą de-
tektavimą rentgeno juostos pagalba

DNR kiekis (pg)	Intensyvumas (santykiniai šviesos vienetai)
50	2,016
40	1,259
30	0,810
20	0,490

2 Palyginimo pavyzdys

Biotinilintos DNR standartinė chemiliuminescencinė analizė
ant neiloninės membranos, panaudojant rentgeno juostą

Slot-blotting membraną gauna ir apdoroja remiantis metodika, aprašyta 1 pavyzdyje. Po inkubavimo 15 min. bėgyje tirpale, kuriame yra AMPPD substratas, minėtą membraną hermetiškai pakuoja į plastikinį maišelį ir eksponuoja 15 min., naudodami rentgeno juostą (firma Kodak XAR). Gautą rentgenogramą įveda į kompiuterį gauto vaizdo analizei (naudoja Cohu kamerą). Gauti rezultatai pateikti 4 lentelėje.

4 Lentelė

Biotinilintos DNR chemiliuminescencijos ant neiloninės membranos intensyvumas, atliekant standartinę analizę rentgeno juostos pagalba

DNR-kiekis (pg)	Intensyvumas (santykiniai šviesos vienetai)
50	1,144
40	0,943
30	0,476
20	0,278

Kaip seka iš 3 ir 4 lentelėse pateiktų palyginamosios analizės rezultatų, atliekant detektavimą chemiliuminescencijos stiprinimo metodu, atliekant membranos džiovinimą džiovinimo spintoje prieš eksponavimą rentgeno juostos pagalba, gauna signalus, kurie maždaug 70 % stipresni, lyginant juos su signalais, generuojamais tradiciniu detektavimo metodu. Atliekant detektavimą chemiliuminescencijos stiprinimo metodu, žymiai sutrumpėja tiek pagrindo inkubavimo laikas, tiek ir eksponavimo laikas. Bendras laikas, kuris reikalingas detektavimui, esant chemiliuminescencijos stiprinimui, yra tik 1/2 to laiko, kuris reikalingas standartinio detektavimo atveju.

3 Pavyzdys

Biotinilintos DNR sustiprintos chemiliuminescencijos analizė, šildymą atliekant kaitinimo lempa prieš detektavimą, panaudojant kamerą prietaisuose su krūvinio ryšiu

Slot-blotting membraną gauna ir apdoroja remiantis metodika, aprašyta 1 pavyzdyje. Po inkubavimo 15 min. bėgyje tirpale, kuriame yra AMPPD substratas, minėtą membraną deda ant blotingui skirto popieriaus lapo ir 15 min. džiovinama IR-kaitinimo lempa su termoreguliacija (Thermajust^R Infra-Red Heater). Šios lempos galingumas 375 W, yra 9 reguliavimo pozicijos. Nuo minėtos membranos lempa turi būti maždaug 21,6 cm atstumu. Membraną išdžiovinus, ją deda po kamerą prietaisuose su krūvinio ryšiu ir ekspozuoja 5 min. Juostų intensyvumas nustatomas remiantis metodika, aprašyta 1 pavyzdyje. Gauti rezultatai pateikti 5 lentelėje.

5 Lentelė

Biotinilintos DNR chemiliuminescencijos intensyvumas ant neiloninės membranos, panaudojant džiovinimą ir šildymą kaitinimo lempa prieš detektavimą, kameros prietaisuose su krūvinio ryšiu pagalba

DNR kiekis (pg)	Intensyvumas (santykiniai šviesos vienetai)
40	2,53
30	1,91
20	1,23
10	0,650

Sustiprinimo efektą galima pastebėti sulyginant šiuos in-

tensyvumo rodiklius su 1 palyginimo pavyzdžio 2 lentelėje pateiktais rodikliais.

4 Pavyzdys

Biotinilintos DNR sustiprintos chemiliuminescencijos analizė, džiovinimą atliekant vakuume prieš šildymą detektavimo metu, panaudojant kamerą prietaisuose su krūviniu ryšiu.

Slot-blotting membraną gauna ir apdoroja remiantis metodika, aprašyta 1 pavyzdyje. Po inkubavimo 15 min. bėgyje tirpale, kuriame yra AMPPD-substratas, minėtą membraną džiovinama 15 min. vakuuminiam eksikatoriuje. Po to išdžiovintą membraną deda ant elektra kaitinamo elemento, kurio temperatūra iki 75°C, po kameros prietaisuose su krūviniu ryšiu, ir eksponuoja 2 min. Juosų intensyvumą analizuoja remiantis metodika, aprašyta 1 pavyzdyje. Gauti rezultatai pateikti 6 lentelėje.

6 Lentelė

Biotinilintos DNR chemiliuminescencijos ant neiloninės membranos intensyvumas, džiovinimą atliekant vakuume prieš šildymą detektavimo metu, panaudojant kamerą prietaisuose su krūviniu ryšiu.

DNR kiekis (pg)	Intensyvumas (santykiniai šviesos vienetai)
40	66,3
30	56,1
20	41,0
10	22,8

Sustiprinimo efektą galima pastebėti atlikus šių intensyvumo rodiklių ir 2 lentelėje esančių rodiklių palyginamąją analizę.

5 Pavyzdys

Biotinilintos DNR sustiprintos chemiliuminescencijos analizė, džiovinant ore ir po to šildant superaukštu dažniu prieš detektavimą, panaudojant kamerą prietaisuose su krūviniu ryšiu.

Slot-blotting membraną gauna ir apdoroja remiantis metodika, aprašyta 1 pavyzdyje. Po inkubavimo 15 min. bėgyje tirpale, kuriame yra AMPPD-substratas, šią membraną deda ant blotingui skirtą popieriaus lapo ir 10 min. džiovina ore. Po to membraną deda į pramoninę superaukšto dažnio krosnelę, kurios galingumas 750 vatų, nustato maksimalų galingumą ir šildo du kartus po 10 sek. Po to membraną deda po kamera prietaisuose su krūviniu ryšiu ir eksponuoja 5 min. Juostų intensyvumą analizuoja remiantis metodika, aprašyta 1 pavyzdyje. Gauti rezultatai pateikti 7 lentelėje.

7 Lentelė

Biotinilintos DNR chemiliuminescencijos ant neiloninės membranos intensyvumas džiovinant ore ir po to šildant superaukštu dažniu prieš detektavimą, panaudojant kamerą prietaisuose su krūviniu ryšiu.

DNR kiekis (pg)	Intensyvumas (santykiniai šviesos vienetai)
40	3,16
30	2,66
20	2,26
10	1,46

Sustiprinimo efektą galima pastebėti atlikus šių intensyvumo rodiklių ir 2 lentelėje esančių rodiklių palyginamąją analizę.

6 Pavyzdys

Biotinilintos DNR sustiprintos chemiliuminescencijos nustatymas, džiovinant vakuume prieš detektavimą, panaudojant kamerą prietaisuose su krūviniu ryšiu.

Slot-blotting membraną gauna ir apdoroja remiantis metodika, aprašyta 1 pavyzdyje. Po inkubavimo 15 min. bėgyje tirpale, kuriame yra AMPPD-substratas, šią membraną deda ant blotingui skirto popieriaus lapo ir džiovina 15 min. vakuuminiam eksikatoriuje. Po to membraną deda po kamera prietaisuose su krūviniu ryšiu ir eksponuoja 5 min. Juostų intensyvumą nustato remiantis metodika, aprašyta 1 pavyzdyje. Gauti rezultatai pateikti 8 lentelėje.

8 Lentelė

Biotinilintos DNR chemiliuminescencijos ant neiloninės membranos intensyvumas, džiovinant vakuume prieš detektavimą, panaudojant kamerą prietaisuose su krūviniu ryšiu.

<u>DNR kiekis (pg)</u>	<u>Intensyvumas (santykiniai šviesos vienetai)</u>
40	1,82
30	1,71
20	1,06
10	0,695

Sustiprinimo efektą galima pastebėti atlikus šių intensyvumo rodiklių ir 2 lentelėje esančių rodiklių palyginamąją analizę.

7 Pavyzdys

Temperatūros įtaka šlapių membranų chemiliuminescenciniam signalui, kurios buvo džiovinamos šildant jas detektavimo metu, panaudojant kamerą prietaisuose su krūviniu ryšiu.

Slot-blotting membranas gauna ir apdoroja remiantis metodika, aprašyta 1 pavyzdyje. Gautas membranas 5 min. inkubuoja AMPPD-substrato tirpale. Po to membraną deda ant elektra šildomos plokštės, laiko iš anksto nustatytoje temperatūroje po kamerą prietaisuose su krūviniu ryšiu ir atlieka seriją fotografavimų, esant 2 min. eksponavimui. Šią procedūrą kartoja su kitomis membranomis skirtingose temperatūrose intervale nuo 24 iki 110°C.

3 Palyginimo pavyzdys

Šlapių membranų šildymo įtaka chemiliuminescenciniam signalui.

Paruošia biotinilintos DNR faga liambda tirpalus, praskiedžiant pradinį-motininį tirpalą (Vector Laboratories, 50 ng/mkl) vandeniniu tirpalu, kuriame yra 0,02 % bromfenolio žydžio, 0,02 % ksilencianolio ir 2,1 % fikolio, ištirpintų 8,0 mM EDTA (etilendiamintetraacto rūgštis). Skiedžia 1:200, 1:400, 1:800 ir 1:1600. Tirpalus šildo 10 min. 65°C temperatūroje ir sudeda į 0,8 %-tinį agaro gelį (10 mkl vienai duobutei), esantį elektroforezinėje akutėje mini-subkultūroms (firma Bio-Rad). Kiekvieno praskiesto tirpalo dublikatus sudeda taip, kad abi gelio pusės būtų identiškos. Elektroforezinę akutę užpildo TTNE-buferiu, pH 8,65 (20 mM tricino, 50 mM Tris-buferio, 5 mM natrio acetato

ir 10 mM EDTA). Elektroforezinis atskyrimas atliekamas per 1 val., esant 80 V elektros įtampai.

DNR perkelia ant neiloninės membranos (MSI), panaudojant elektrobloterį Hoefer Mighty Small TransphorTM Electroblot (TE 22) ir palaikant 4°C temperatūrą vonios su šaldymo gyvatuku pagalba. Perkėlimą atlieka 20 min. bėgyje, esant 40 V įtampai, o po to dar 20 min. bėgyje, esant 50 V įtampai, panaudojant TTNE-buferį. Po to membraną 5 min. džiovina kaitinimo lempa ir 2 min. siuva UV-spinduliais remiantis metodika, aprašyta 1 pavyzdyje. Po to membranas perpjauna pusiau ir naudoja analizėje.

Po to membranas 20 min. inkubuoja ¹²⁵I-žymės gesinimo buferyje, keisdami minėtą buferį kas 5 min. Po to membranas 30 min. inkubuoja avidino ir šarminės fosfatazės konjugate, komercinis pavadinimas AvidxTM, ir praplauna remiantis metodika, aprašyta 1 pavyzdyje. Vėliau kiekvieną membranos pusę 5 min. inkubuoja 0,2 mM AMPPI-substrato tirpale ir po to hermetiškai pakuoja į plastikinį maišeli. Praėjus daugiau kaip 7 min., membranas eksponuoja 12 min., naudodami rentgeno juostą. Sulygina visų membranų pusių gautus signalus. Praėjus 12 min., membranas apdoroja tokiu būdu: 1/2 membranos hermetiškai pakuoja kairėje minėto maišelio pusėje; 1/2 membranos ištraukia iš to plastikinio maišelio ir džiovina kaitinimo lempa esančia virš jo, nors maišelyje esanti membrana šildymo metu ir toliau yra šlapia, be to, kitas membranų puses, hermetiškai supakuotas tuose maišeliuose, deda 10 min. į vandens vonią, kurios temperatūra 37, 60 arba 75 °C.

Visos tokiu būdu apdorotos membranų pusės eksponuojamos dar 12 min., panaudojant rentgeno juostą. Gauti tokie rezultatai.

Taigi, membranos, kurią džiovina šildydami kaitinimo lempa, signalas yra stipresnis už kontrolinį. Membranų, kurias šildo 37°C temperatūroje, šlapioje būsenoje generuojami signalai yra analogiški kontroliniam. Šlapių membranų, kurios šildomos iki 60°C, generuojami signalai yra silpnesni už kontrolinį. Abi membranos, kurias šlapioje būsenoje šildo kaitinimo lempa, ir membrana, kurią šlapioje būsenoje šildo 75°C temperatūroje, signalo, kuri būtų galima išskirti, negeneruoja. Čia pateikti tyrimai rodo, kad šlapios membranos šildymas neleidžia žymiai pagerinti signalo išskyrimą arba sumažinti jo generavimą priklausomai nuo temperatūros.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Fermentais apdorotų 1,2-dioksetanų chemiliuminescencijos sustiprinimo būdas, esant detektavimo tiriamame pavyzdyje gali-
mybei, pasižymintis tuo, kad

a) gauna kietafazį pagrindą su ant jo esančiu tiriamuoju pavyzdžiu; šis pagrindas yra atitinkamai apdorotas tirpalu, kuriame yra fermentais paveikti 1,2-dioksetanai;

b) džiovinama minėtą kietafazį pagrindą; ir

c) kai kuriais atvejais minėtą kietafazį pagrindą šildo arba betarpiškai jo džiovinimo proceso metu, arba jau po džiovinimo; be to, džiovinama ir/arba šildoma arba prieš detektavimą, arba betarpiškai detektavimo proceso metu.

2. Būdas pagal 1 p., b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad džiovinama prieš detektavimą.

3. Būdas pagal 1 p., b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad džiovinama prieš detektavimą, o šildoma detektavimo metu.

4. Būdas pagal 1 p., b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad džiovinama ir šildoma prieš detektavimą.

5. Būdas pagal 1 p., b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad džiovinama detektavimo metu.

6. Būdas pagal 1 p., b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad džiovinimas ir šildymas derinami detektavimo metu.

7. Būdas pagal 1 p., b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėtą džiovinimą užtikrina veikdami kietafazį pagrindą tam tikrą laiką ir tam tikroje temperatūroje poveikio priemonėmis,

parinktomis iš grupės, į kurią įeina džiovinimas vakuume, konvekcinis džiovinimas, džiovinimas ore, džiovinimas panaudojant superaukštą dažnį arba elektros energiją.

8. Būdas pagal 7 p., b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad džiovinama vakuume 15-30 min. aplinkos temperatūroje.

9. Būdas pagal 7 p., b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad konvekcinis džiovinimas atliekamas konvekciniame džiovinantuve 5-30 min. bėgyje 30-100°C temperatūroje.

10. Būdas pagal 7p., b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad ore džiovinama mažiausiai 30 min. aplinkos temperatūroje.

11. Būdas pagal 1p., b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad šildymą užtikrina veikdami minėtą kietafazį pagrindą tam tikrą laiką ir tam tikroje temperatūroje atitinkamomis poveikio priemonėmis, parinktomis iš grupės, į kurią įeina šildymas elektra, šildymas IR-spinduliais, konvekcinis šildymas ir šildymas superaukštu dažniu.

12. Būdas pagal 11 p., b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėtas šildymas atliekamas 1-10 min. bėgyje 40-100°C temperatūroje.

13. Fermentais apdorotų 1,2-dioksetanų chemiliuminescencijos sustiprinimo būdas, esant detektavimo tiriamame pavyzdyje galimybei, naudojamas kietafazei analizei ir pasižymintis tuo, kad:

a) gauna kietafazį pagrindą su ant jo esančiu vienu specifiskai jungiančios poros komponentu;

b) prideda tirpalą, kuriame yra papildomai sujungtas kitas komponentas, kuris arba betarpiškai yra konjuguotas su fermentu

tine žyme, arba gali po to prijungti kitą komplekso, konjuguoto su fermentine žyme, komponentą;

c) kai kuriais atvejais minėtą kietafazį pagrindą inkubuoja tirpale, kuriame yra čia paminėtas antrasis jungiančios poros komponentas, konjuguotas su fermentine žyme;

d) inkubuoja minėtą kietafazį pagrindą, kuriame yra specifiškai sujungta pora arba poros ir fermentinė žymė;

e) džioviną minėtą kietafazį pagrindą; ir

f) kai kuriais atvejais minėtą kietafazį pagrindą šildo jo džiovinimo proceso metu arba jau po džiovinimo; be to, pagrindas džiovinamas ir/arba šildomas arba prieš detektavimą, arba betarpiškai detektavimo proceso metu.

14. Būdas pagal 13 p., b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad čia minėtu kietafazių pagrindų naudoja hidrofobinį pagrindą, parinktą iš grupės, į kurią įeina neiloninės membranos, polimerinės mikrogranulės (karoliai) ir mikrotitravimo planšetės.

15. Būdas pagal 13 p., b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėtos specifiškai sujungtos poros yra parinktos iš grupės, į kurią įeina papildomi nukleino rūgščių siūlai, kompleksas antikūnis-antigenas, vitaminas-surištas baltymas ir baltymas, surištas su nukleino rūgštimi.

16. Būdas pagal 13 p., b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėtu 1,2-dioksetanu naudoja 3-(2'-spiroadamantan)-4-metoksi-4-(3"-fosforiloksi)fenil-1,2-dioksetaną, o antruoju jungiančiuoju komponentu naudoja šarminės fosfatazės konjugatą; arba minėtu 1,2-dioksetanu naudoja 3-(2'-spiroadamantan)-4-metoksi-4-(3"- β -D-galaktopiranoziloksifenil)-1,2-dioksetaną,

o antruoju jungiančiuoju komponentu naudoja β -D-galaktozidazę.

17. Būdas pagal 13 p., b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad chemiliuminescencinio signalo intensyvumą nustato panaudodami aparatūrą, parinktą iš grupės, į kurią įeina rentgeno juosta, fotodaugintuvas arba elektroninis vaizdo detektorius.

18. Būdas pagal 13 p., b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad naudoja analizę, parinktą iš grupės, į kurią įeina kietafazė imunofermentinė analizė (ELISA), DNR-tipavimas ir blotinganalizė pagal Sauzerno, Nazerno ir Vesterno metodą.

VALSTYBINIS PAT