

(11) Patent numeris: **4681**

(51) Int. Cl.⁷ **G01N 33/487**

(21) Paraiškos numeris: **99-119**

(22) Paraiškos padavimo data: **1999 09 24**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **2000 04 25**

(45) Patent paskelbimo data: **2000 07 25**

(86) Tarptautinės paraiškos numeris: **PCT/US98/04377**

(86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: **1998 02 27**

(85) Nacionalinės procedūros pradžia: **1999 09 24**

(31, 32, 33) Prioritetas: **60/039,419, 1997 02 28, US**

(72) Išradėjas:

Jorma Virtanen, US

(73) Patent savininkas:

**BURSTEIN LABORATORIES, INC,
15373 Barranca Parkway, Suite I 101, Irvine, CA 92618, US**

(74) Patentinis patikėtinis:

Liudmila Gerasimovič, 9, J. Basanavičiaus g. 16/5-41, 2009 Vilnius, LT

(54) Pavadinimas:

Laboratorija optiniame diske

(57) Referatas:

Aprašomas aparatas, kuriame yra optinis diskas, tinkamas nuskaitymui optinio nuskaitymo įrenginio pagalba, turintis pirmąjį sektorių, turintį iš esmės savarankiškas tyrimo priemones analitės, numanomoms, jog ji yra pavyzdyje bent vienoje iš anksto nustatytoje vietoje, surišimui arba reagavimui; nebūtinai, antrąjį sektorių, turintį kontrolines priemones, skirtas tyrimo atlikimui ir analitės padėties informacijos dėl vienos ar daugiau analizių, numanomų esant pavyzdyje, pateikimui į nuskaitymo įrenginį, ir kur analitės buvimas arba nebuvimas minėtoje padėtyje yra nustatomas nuskaitymo įrenginiu, naudojant kontrolines priemones ir padėties informaciją. Priklausomai nuo tyrimo prigimties, diskas apima skysčio kaupimo priemones, skysčių perdavimo priemones, pavyzdžiui, viena arba daugiau kapiliarų, vožtuvus, baterijas, dializės priemones, kolonėles, filtrus, elektros lauko šaltinius, laidus ir kitas elektrai laidžias priemones, pavyzdžiui metalo paviršines dangas ir pan.

Išradimas liečia diagnostinius tyrimus ir jų metodikas. Konkrečiai, čia aprašomi diagnostinių tyrimų blokai, sukonstruoti kompaktiniame optiniame diske, bei jų naudojimo metodikos.

5

Yra didžiulis poreikis, kad klinikiniai tyrimai būtų atliekami greičiau, mažesnėmis sąnaudomis ir paprasčiau. Idealiu atveju pacientas, jei jis to pageidauja, tyrimus galėtų atlikti pats. Vienas iš būdų pasiekti šį tikslą yra įvairių tyrimų operacijų miniatiūrizavimas ir integravimas. Šiuo metu biolustų tyrimų pavyzdžiai (taip vadinami dėl jų sukūrimui naudojamos silicio drožlių poligrafijos metodų) yra komerciškai prieinami arba yra kūrimo stadijoje. Visiems šiems pirmiesiems žingsniams reikalingas nuskaitymo įrenginys ir kompiuteris.

Pardavime yra taip pat disko formos kasetės, naudojamos klinikiniuose tyrimuose kartu su UV/Vis spektrofotometrija. JAV patente Nr. 5122284 aprašomas centrifuginis rotorius, kuris talpina daugybę tarpusavyje sujungtų skysčio kamerų, prijungtų prie daugybės kiuvečių. Rotorius yra taip pritaikytas, jog gali būti naudojamas įprastoje laboratorinėje centrifugoje ir yra pagamintas iš medžiagų, kurios netrukdo tyrimams, atliekamiems reakcinėse kiuvetėse, bei tyrimų rezultatų fotometrinei detekcijai. Yra aprašytas didžiulis kiekis rotoriaus konfigūracijų, susietų su to pačio arba panašaus tipo analizių aparatais. Žiūrėti, pvz., JAV patentus Nr. 5472603; 5173193; 5061381; 5304348; 5518930; 5457053; 5409665; 5160702; 5173262; 5409665; 5591643; 5186844; 5122284; 5242606; ir čia vadinamus patentus. Liofilizuoti reagentai tokioms sistemoms aprašyti JAV patente 5413732.

Centifuginio analizatoriaus principai yra pritaikyti diskui, kuris kaip instrumentas gali būti naudojamas CD-tvarkyklėje (Mian, et al., WO 97/21090 paraiška).

Mian pateikia modifikuotą CD-tvarkyklę, turinčią dvigubą funkciją: 1 - ji naudojama diske saugomai informacijai nuskaityti ir 2 - naudojama disko sukimui. Tačiau Mian nepateikia CD-tvarkyklės nuskaitymo gebos panaudojimo mus
5 dominantiems tyrimams analizuoti.

Nežiūrint dabartinių pasiekimų, išlieka paprastesnės tyrimo schemos poreikis, kas įgalintų tyrimus atlikti greitai, efektyviai, tiksliai ir nedideliais kaštais. Šis
10 išradimas apjungia diagnostinius tyrimus su kompiuteriais ir kompaktinio disko technologija. Optimaliausiame išradimo variante reikalingas vien tik kompiuteris su kompaktinio disko nuskaitymo įrenginiu. Visi cheminiai tyrimai atliekami kompaktinio disko, kuris gali būti
15 priskirtas integruotam biokompaktiniam diskui (IBCD), viduje. Tame pačiame kompaktiniame diske taip pat yra užšifruota programinė įranga, t., y., mašina nuskaityta instrukcinė ir kontrolinė informacija, kuri kompiuteriui pateikia instrukcijas prieš tyrimą, jo metu ir po tyrimo.

20 CD_i ir DVD_i atstovauja ekonomiškiausią ir, daugeliu atvejų, geriausią informacijos kaupimo aplinką. Reikia pažymėti, kad CD ir DVD yra plačiai naudojami akronimai, kurie ateityje gali kisti, net jei pagrindinės
25 technologijos išliks fundamentaliai nepakitę. CD- arba DVD-tvarkyklė atskirais aspektais yra ekvivalentiška skenuojančiam konfokusiniam mikroskopui. Tuo pat metu šie instrumentai yra prilyginami geroms centrifugoms, kadangi sukimosi greitis komercinėse tvarkyklėse yra 200-12000
30 aps./min. ir šis greitis gali būti reguliuojamas tam tikrose ribose. Apjungiant šias tris charakteristikas į vieną analitinę sistemą, gaunamas didžiulis supaprastinimas, lyginant su bet kuria kita analitine technika. Beje, darbo atlikimas yra lygiavertis arba
35 geresnis už tą lygį, kurį duoda daugelis konkuruojančių metodų. Nors šis išradimas reikalauja šiek tiek modifikuotų CD- arba DVD-tvarkyklių, šiuos pakeitimus yra

įmanoma įterpti į komercines tvarkykles. Tai leis šį išradimą pritaikyti Pacientų slaugos punktuose (POPC) ir namuose. CD- arba DVD-tvarkyklių panaudojimas užtikrins, bet kokio pavyzdžio tikslią skaitmeninę analizę, 5 nenaudojant jokių specifinių analitinių instrumentų.

Išradimas apima optinį diską, adaptuotą nuskaitymui optinio įrenginio pagalba, kurio pirmas sektorius turi iš esmės savarankiškas tyrimo priemones analitės, numanomos, 10 jog ji yra bandinyje, surišimui bent vienoje iš anksto nustatytoje pirmo sektoriaus vietoje, ir, kuris nebūtinai turi kontrolines priemones antrame sektoriuje, skirtas tyrimo atlikimui ir analitės padėties informacijai, atsižvelgiant į vieną arba daugiau 15 analičių, numanomų esant pavyzdyje (bandinyje). Analitės buvimas arba nebuvimas minėtoje vietoje yra nustatomas nuskaitymo įrenginiu, naudojant kontrolines priemones ir padėties informaciją. Priklausomai nuo tyrimo rūšies, diskas gali talpinti skysčių laikymo priemones, skysčių 20 perdavimo priemones, pvz., vieną arba keletą kapiliarinių kanalėlių, vožtuvus, baterijas, dializatorius, kolonėles, filtrus, elektros lauko šaltinius, laidus arba kitus elektros laidininkus, pvz., metalines paviršines dangas ir pan.

25 Diskas gali turėti vieną arba kelias bandinio įvedimo angas, kad pavyzdžio skystis pasiektų tyrimų sektorių. Pageidautina, kad tokios angos būtų taip hermetizuojamos, kad po pavyzdžio įvedimo į diską, šis hermetizuotas 30 diskas, talpinantis pavyzdį, turėtų hermetiškai uždarytą įtaisą, kuris gali būti atitinkamai pašalinamas, naudojant įprastus būdus arba kitus pašalinimo mechanizmus, skirtus biologinėms atliekoms. Taip pat disko tyrimo sektorius yra atitinkamai suskirstytas į 35 įvairius poskyrius, skirtus pavyzdžio (bandinio) paruošimui ir analitės atskyrimui. Taip pat gali būti numatytas tinkamas atliekų priėmimo poskyris. Tyrimų

sektorius gali būti suskirstytas į daugybę smulkesnių sektorių, kurių kiekvienas gauna po pavyzdį. Kiekvienas toks smulkesnis sektorius gali analizuoti vieną arba daugiau analičių, priklausomai nuo konkretaus uždavinio.

5

Kitas išradimo aspektas yra tyrimams atlikti aparatas, turintis optinį diską, disko nuskaitymo įrenginį ir informacijos procesorių, diske yra pirmasis sektorius su iš esmės savarankiškais tyrimo priemonėmis bent vienai
10 numanomai analitei, esančiai pavyzdyje, lokalizuoti iš anksto nustatytoje vietoje pirmame sektoriuje ir, nebūtinai, antrasis sektorius, turintis kontrolinę informaciją, skirtą tyrimo atlikimui ir analitės padėties informacijai, atsižvelgiant į vieną arba daugiau
15 analičių, numanomų esant pavyzdyje. Informacija patenka į nuskaitymo įrenginį ir apdorojama informacijos procesoriuje; diskas yra pritaikytas nuskaitymui nuskaitymo įrenginiu, o informacijos procesorius yra pritaikytas nustatyti analitės buvimą arba nebuvimą
20 minėtoje padėtyje, naudojant kontrolinę informaciją ir padėties informaciją. Aparatas gali turėti nuskaitymo įrenginį, turintį CD-ROM arba DVD nuskaitymo įrenginį ir informacijos procesorių, pvz., personalinį kompiuterį.

25 Išradimo dar vienas aspektas yra optinis diskas, tinkamas nuskaitymui su CD-ROM arba DVD nuskaitymo įrenginiu, turinčiu savarankiškas tyrimo priemones, skirtas analitės, numamos esant pavyzdyje, lokalizavimui bent vienoje iš anksto nustatytų vietų diske bei priemonės
30 minėtoje vietoje patvirtinti analitės buvimą arba nebuvimą, pasinaudojant CD-ROM arba DVD nuskaitymo įrenginiu.

Trumpas brėžinių aprašymas

35

1 Fig. schematiškai atvaizduotas šio išradimo diskas.

2A Fig. detaliau pateiktas diske patalpinto pavyzdžio ruošimo ir tyrimo sektoriaus schematinis vaizdas, iliustruojantis tipinio tyrimo sektoriaus bendrą išdėstymą.

5

2B Fig. schematiškai atvaizduotas išplėstas tyrimų sektorius, kuris gali atlikti imuninius tyrimus, DNR testus, ląstelių skaičiavimą, spektrofotometrinius tyrimus ir elektrolitų analizę.

10

3 Fig. pateikia disko schematinį vaizdą, iliustruojantį tyrimo sektorių daugetą, kur kiekvienas sektorius turi individualią pavyzdžio įvedimo angą.

15 4 Fig. pateikiamas detalesnis vieno iš tyrimų sektorių, pavaizduotų 3 Fig., schematinis vaizdas.

5 Fig. schematiškai vaizduoja cheminiu būdu suaktyvinamą bateriją, naudojamą šiame išradime.

20

6 Fig. atvaizduotas struktūros, skirtos atlikti dializės funkciją diske, schematinis vaizdas.

25 7 Fig. pateikia kolonėlės, kuri gali būti patalpinta diske, schematinį vaizdą.

8 Fig. schematiškai vaizduoja elektros pagalba reguliuojamą vožtuvą, naudojamą šiame išradime.

30 9 Fig. pateikia šiame išradime naudojamų reagentų rinkinį, sujungtą kapiliariniais kanalėliais, schematinį vaizdą.

10 Fig. schematiškai vaizduoja linijinių tyrimo vietų, 35 kurios yra patogiai išdėstytos disko tyrimų sektoriaus sroviniame kanale, išdėstymo tvarką.

11A-C Fig. schematiškai vaizduoja tyrimo blokų variantus, kurie konkrečiai naudojami virusinių ir bakterinių dalelių bei ląstelių detekcijai, naudojant bendras metodikas, skirtas nustatomos medžiagos vietos specifinei lokalizacijai.

12A-C Fig. schematiškai vaizduoja detekcijos metodikų variantus, kur neskaidrios dalelės yra naudojamos vietoj atspindinčių dalelių ir yra surištos su atspindinčiu paviršiumi. Laužtinės (zig-zag) linijos vaizduoja oligonukleotidus, bet tai gali būti bet kokios atpažinimo molekulės, pvz., antikūnai. Šiame pavyzdyje dalelės yra plastikinės sferos, bet gali būti liposomos, ląstelės ir t.t.

13 Fig. schematiškai atvaizduotas tyrimų blokas, iliustruojantis tarpininką-molekulę su komponentų atšakomis ir skaldymo sritimi, surištą vienu galu su disko paviršiumi ir su perdavimo elementu (aukso arba latekso sfera) kitame gale.

14A Fig. schematiškai vaizduoja pirmąjį tyrimo elementą tyrimo procedūros pradžioje.

14B Fig. schematiškai vaizduoja antrąjį tyrimo elementą tyrimo procedūros ankstyvoje stadijoje.

14C Fig. pateikia 14A Fig. tyrimo elemento schematinį vaizdą, kur analitės molekulės atšakos susijungusios, sudarant jungiamąją kilpą tarp skaldymo srities grupių.

14D Fig. schematiškai vaizduoja 14B Fig. tyrimo elementą, kur analitės molekulės atšakos nėra susijungusios ir jungiamoji kilpa nesusidariusi tarp skaldymo srities grupių.

14E Fig. schematiškai vaizduoja 14C Fig. tyrimo elementą po tarpininko molekulės suskaldymo. Perdavimo elementas pasilieka surištas su disko paviršiumi atskirame taške.

5 14F Fig. schematiškai vaizduoja 14D Fig. tyrimo elementą po tarpininko molekulės suskaldymo. Perdavimo elementas yra atsikabinęs nuo disko paviršiaus ir gali būti nuplaunamas nuo konkrečios vietos.

10 15 Fig. schematiškai vaizduoja kiuvečių rinkinį. Šiame pavyzdyje parodytos keturios kiuvetės ir su jomis sujungtos reagentų ir pavyzdžio ruošimo kameros, o taip pat šviesos šaltiniai.

15 16 Fig. schematiškai vaizduoja daugybę kapiliarų, kurie gali būti naudojami atliekant izoelektrinę fokusavimą.

17 Fig. schematiškai vaizduoja aparatą, skirtą tikslių tūrių matavimui.

20

Bendras integruoto bio-kompaktinio disko (IBCD) scematinis vaizdas parodytas 1 Fig. Diskas (Bio-Kompaktinis Diskas, BCD) faktiškai gali būti bet kokios formos ir dydžio. Praktiškiausia jo forma yra skritulys,

25 turintis 10-1000 mm skersmenį, tinkamiausias skersmuo - 20-200 mm ir esantis 0,1-20 mm storio, tinkamiausias storis yra 0,5-3 mm. Diskas turi du sektorius: tyrimo sektorių 1 ir programinės įrangos sektorių 2. Centrinė skylė 3 skirta disko patalpinimui į kompaktinio disko
30 nuskaitymo įrenginį. Programinė įranga, skirta tyrimo kontrolei, gali būti atskirame diske. Vienok, yra pageidautina, jog programinė įranga būtų diske, sujungtame su konkrečios analizės arba analizių tyrimu, kad, atliekant tyrimą, iki minimumo būtų sumažinta
35 galimybė atsirasti subjektyvioms klaidoms. Galimi IBCD komponentai ir pavienės operacijos pateikiami aprašyme.

Įprastiniuose CD-ROM arba DVD nuskaitymo įrenginiuose diskas sukasi iki 16000 aps./min. greičiu. Visuose CD-ROM ir DVD nuskaitymo įrenginiuose greitis yra reguliuojamas tam tikrose ribose (200-16000 aps./min.). Tačiau kai kurioms operacijoms gali būti paranku naudoti skirtingų greičių sukimasi, pvz., 1000-10000 aps./min., tinkamiausia - 2000-5000 aps./min. Bet kokiam konkrečiam tyrimui kontroliuojanti programinė įranga analizavimo metu užduoda sukimosi režimą. Šis režimas, greičiai ir veiksmų sinchronizavimas, įskaitant periodą, kada nevyksta sukimasis dėl inkubacijos, elektroforezės, izoelektrinio fokusavimo ir t. t., yra reguliuojamas, kad reagentai ir pavyzdys (bandinys) būtų pristatyti į atitinkamas tyrimo sektoriaus vietas, kaip yra nurodyta tyrimo protokoluose. Tinkami sukimosi greičiai užtikrina pakankamą išcentrinę jėgą, kuri gali būti naudojama skysčių judėjimui užtikrinti. Kitas energijos šaltinis, kuris gali būti lengvai pritaikomas IBCD, yra cheminė energija. Labiausiai tinkama cheminės energijos forma yra baterijų teikiama elektros energija. Mechaninė ir cheminė energijos užtikrina daugelio rūšių blokų darbą. Svarbūs IBCD blokai gali talpinti vieną arba daugiau komponentų: kapiliarus, konteinerius, filtrus, dializės membranas, chromatografines kolonėles, elektroforetinius gelius, vožtuvus, bet kokius mikromechaninius arba elektroninius mazgus, įskaitant mikroprocesorius, elektrodus, ypač enziminius elektrodus, kiuvetes bei tyrimo blokus. Galimos pavienės operacijos atliekamos blokuose, apimant: centrifugavimą, filtravimą, skysčių perdavimą, skysčių sumaišymą, dializę, frakcionavimą kolonėlėse, kaitinimą, šaldymą, elektrokonvekciją, elektroforezę bei analitės detekciją ir pranešimą apie tai.

Paprastai IBCD yra pagamintas iš dviejų dalių, turinčių viršutinę ir apatinę puses. Apatinė pusė gali turėti beveik visus blokus, tuo tarpu viršutinė pusė gali būti plokščias dangalas, turintis tik keletą blokų, pvz.,

elektrodus ir laidus. Šiame išradime sluoksnių kiekis gali viršyti du ir daugelis blokų, kaip moduliai, gali būti paruošti iš anksto. Reagentų konteinerius, kiuvečių rinkinius, kolonėles, mikromechaninius blokus, šviesos šaltinius ir mikroprocesorius naudingiausia sumontuoti kaip modlius. Įvairios charakteristikos gali būti išpaustos minkštame plastike. Įvairūs blokai gali būti priklijuojami terminiu arba UV-vulkanizavimo būdu, sulydžius kartu, sujungiant papildomomis mechaninėmis priemonėmis, mechanškai įdedant arba tiesiog uždarant mažesnę komponentą didesnio viduje. Kai kurie plotai, gali būti apdorojami, pvz., plazmos amoniaku, kad juos padaryti hidrofilišiais. Po to paviršių galima apdoroti įvairiomis molekulėmis, kad paviršius taptų inertinis arba, priešingai, įgautų specifines adsorbcines savybes. Sililimas yra bendras metodas paviršių apdorojimui (Virtanen, J. A., Kinnunen, P. K. J. ir Kulo, A., "Organosilanes and their hydrolytic polymers as surface treatment agents for use in chromatography and electronics", JAV patentas 4756971). Kovalentinis detergentų prijungimas sumažins proteinų, pvz., albumino, adsorbciją, o taip pat sumažins tirpių proteinų adsorbciją. Metalų elektrodai ir laidai gali būti užgarinami ant pageidaujamų plotų. Maskuotės arba varžos gali būti naudojamos plazmos lokalizavimui arba metalo nusodinimui. Kapiliariniai vamzdeliai ir skysčio saugojimo bei sulaikymo blokai gali būti įterpiami į optinius diskus arba suformuoti cheminiu būdu arba įpurškimo pagalba. Kaip parodyta 2 Fig., tyrimo sektorius gali turėti pavyzdžio įvedimo angą 14. Pavyzdžio angą pageidautina hermetizuoti tokiu būdu, kad diskas būtų efektyviai sandarus, išskyrus būtinius kanalus skysčio srovei, ir apsaugotas nuo bet kokių biologinių teršalų. Naudojant gerai žinomas įvairias priemones, pvz., išcentrinę jėgą ir pan., pavyzdžio porcija yra paduodama į pavyzdžio ruošimo vietą 15, kuri gali turėti reagentus ir pan., kad atlikti tyrimą. Alternatyviai, arba kartu su

reagentais jau pavyzdžio ruošimo segmente gali būti numatytas reagentų rinkinėlį 6, esant reikalui, tiekimas į pavyzdžio ruošimo segmentą reikalingu eiliškumu. 9 Fig. yra parodytos reagentų rinkinėlio papildomos detalės. Gali būti reikalinga iš pavyzdžio bent dalinai atskirti analitę ir tai gali būti atlikta pavyzdžio atskyrimo segmente, bendrai pažymėtame kaip 7. Jei atskyrimo procese reikalinga elektros energija, yra numatyta baterija 8. Papildomos baterijos detalės yra parodytos 5 Fig. ir aprašytos žemiau. Gautas pavyzdys toliau perduodamas į tyrimo vietą 9. Optimaliame išradimo variante tyrimo vieta turi tyrimo bloką, tai detaliai aprašyta žemiau. Analitė, jei ji yra pavyzdyje, prisiriša prie iš anksto nustatytos vietos ant disko ir analitės buvimas detektuojamas nuskaitymo įrenginiu iš informacijos, tai identifikuoja konkrečią analitę toje padėtyje, prie kurios ji prisirišusi. Yra numatytas atliekų skyrius reagentams arba pavyzdžio tūriams surinkti, kurie yra didesni už įvedamus tyrimui kiekius, o įvairūs skyriai ir skysčių perdavimo kanalai leidžia, atitinkamai, skysčiui tekėti visame tyrimo sektoriuje.

Viename išradimo variante gali būti numatyta gausybė tyrimo sektorių 11, 12, 13 ir t. t., kaip parodyta 3 Fig., su individualiomis pavyzdžio įvedimo angomis 14, 15, 16, atitinkamai. Kiekvienas sektorius iš esmės veikia, kaip aprašyta, tuo pačiu laiku atliekant skirtingus tyrimus konkrečiuose sektoriuose su daugeliu analizių arba daugeliu pacientų. Konkretaus sektoriaus detalės parodytos 4 Fig., kur įvairūs galimi blokai yra identifikuoti tais pačiais numeriais, kurie naudojami ankstesniame aprašyme.

Blokai

35

Kaip parodyta 5 Fig., gali būti numatyta baterija, kurią paprastai sudaro du metalo sluoksniai, pvz., varis ir

cinkas, kurie, atitinkamai, yra apatinėje ir viršutinėje ertmės pusėse. Nedarbo metu jie yra atskirti oro sluoksniu. Kada diskas sukasi, ertmė tarp šių metalų prisipildo praskiesta neorganine rūgštimi, priklausomai nuo metalo elektrodų rūšies. Vario ir cinko atveju tai gali būti praskiesta sieros rūgštis, turinti vario jonų, ir baterija yra suaktyvinama. Ši baterija generuoja 1,5 V įtampą apie 1 val. Tokia laiko trukmė yra ilgesnė už reikalingą analizei atlikti laiką. Jei būtina, iš kitų medžiagų bei storesnių metalo sluoksnių gali būti pagaminamos ilgesnio veikimo baterijos. Svarbu, jog, vandeniui patenkant į ertmę tarp metalo sluoksnių, baterija yra dezaktyvuojama. Suaktyvinimo ir dezaktyvinimo ciklai gali būti kartojami keletą kartų. Jei būtinas didesnis potencialas, keletas baterijų gali būti apjungiamos. Į elektros grandinę gali būti įterpti fotodiodai. Šiuo atveju numatyta, kad kontroliuojantis tyrimą kompiuteris turi informaciją apie aktyvias elektros grandines. Taip pat gali būti naudojama miniatiūrizuota, iš anksto surinkta baterija, kuri gali būti suaktyvinama, sujungiant elektros grandinę druskos, pvz., natrio chlorido, tirpalu.

Skysčio ir oro perdavimui pageidautina naudoti kapiliarus. Kapiliaruose taip pat gali būti laikomi labai maži tūriai skysčio. Gerai, kai oro kapiliarai būtų hidrofobiniai, o tuo tarpu kapiliarai, kontaktuojantys su vandeniu, būtų hidrofiliniai. Jei būtina, kapiliarai, gali būti apvalaus arba stačiakampio pjūvio. Įprastinis gylis yra nuo 10 μm iki 500 μm , tuo tarpu plotis yra tarp 50 μm ir 2 mm. Oro kapiliarai yra didesnių dimensių, kad būtų išvengiama slėgio gradiento susidarymo, nebent pageidaujama kitaip. Srovės greitis priklauso nuo IBCD sukimosi dažnio, kapiliaro dimensių ir klampumo bei skysčio tankio. Fizikinės skysčio savybės yra sąlygojamos tyrimo pobūdžio, o sukimosi dažnis yra ribojamas iki tam

tikro dydžio CD-ROM arba DVD nuskaitymo įrenginiu. Tokiu būdu, skysčio perdavimo greičiui reguliuoti yra naudojamos kapiliarų dimensijomis. Kapiliarų vamzdeliai gali būti numatyti su "butelių kaklais", t. y., su skersinio pjūvio susiaurėjimais tam, kad būtų galima reguliuoti skysčių tekėjimą norimu greičiu. Tam pačiam tikslui gali būti panaudojamas hidrofiliškumas ir hidrofobiškumas.

10

Tikslūs kapiliarų tinklo ir kamerų matmenys gali būti aprašomi Navier-Stokes lygtimi:

$$\rho v = \rho b - \nabla p + \mu \nabla^2 v$$

15

kur ρ yra tankis, p yra slėgis, v reiškia greitį, b yra kūno jėgos laukas, μ yra klampumas ir ∇ yra diferencialinis operatorius *del* (Mase, Continuum Mechanics, McGraw-Hill, 1970). Slėgis yra skaliarinis laukas, tuo tarpu v ir b yra vektoriniai laukai. Sudėtingos geometrijos Navier-Stokes lygties sprendimui tinka komercinė kompiuterinė programinė įranga.

20

Pavyzdžio įvedimui, reagentų saugojimui, reakcijų atlikimui bei atliekų surinkimui naudojami konteineriai arba sekcijos, suformuoti diske. Jų gylis yra apie 1-2000 μm , pageidautina apie 10-800 μm , ir jie gali turėti bet kokią įmanomą formą, nors tinkamiausios yra apvalaus arba stačiakampio pjūvio. Sekcijos yra hidrofilinės, išskyrus vieną atliekų konteinerio galą, kuris turi hidrofobinį oro kapiliarą. Reakcijos sekcijos gali būti suformuotos su elektrodais, skirtais kaitinimui, elektrokonvekcijai arba elektrocheminiams tikslams. Pageidautina, kad elektrodai būtų kokybiškai užgarintos aukso plėvelės. Sekcijos taip pat gali turėti vožtuvus, kurie yra valdomi elektros arba chemikalų pagalba, kaip aprašyta žemiau.

30

35

Saugojimo konteineriai gali būti padengti metalu, pageidautina, auksu, kad būtų išvengta vandens prasiskverbimo į plastiko vidų. Reagentai taip pat gali būti iš anksto supakuoti į kasetes, kurios yra
5 nepralaidžios. Šios kasetės saugojimo metu gali būti uždaros ir yra atidaromos rankiniu būdu praduriant arba atidarant vožtuvą arba kamštį pavyzdžio kasetės patalpinimo į diską metu. Taip pat kasetės atidarymas gali būti palengvinamas išcentrinės jėgos dėka, kada IBCD
10 pradeda suktis. Bet kuriuo atveju tyrimo metu palaikoma tinkama skysčio srovė, reguliuojama kompiuterio per CD arba DVD nuskaitymo įrenginį.

Tyrimo metu skysčio srovę galima reguliuoti atspindinčio
15 elemento pagalba. Atspindintis elementas naudoja lazerį, kuris yra CD arba DVD nuskaitymo įrenginyje, ir tą faktą, kad, net skysčiui esant skaidriam, jo atspindžio rodiklis žymiai skiriasi nuo oro rodiklio. Tokiu būdu, esant orui, lazerio šviesa atsispindi atgal į CD arba DVD
20 nuskaitymo įrenginį, ir kitokia kryptimi - esant skysčiui, arba priešingai. Kitas metodas kontroliuoti skysčio srovę yra aktyvios šviesos šaltinio panaudojimas, pvz., LED arba puslaidininkinio lazerio. Tokia šviesa gali būti sustiprinta, esant elektrai laidžiam skysčiui,
25 pvz., plazmai arba buferiui, suaktyvinantiems elektroninės grandinės sujungimą.

Informacijos perdavimui iš IBCD į CD arba DVD-nuskaitymo įrenginį ir į kompiuterį gali būti naudojamas LC-
30 displėjus. LC-displėjus gali turėti didelį skaičių taškelį (pikselių), atspindinčių šviesą, kai LC-plėvelės turi potencialą. Šie taškai gali būti, pvz., išdėstyti linijine tvarka, tokiu būdu, kad viename gale šviesos atspindėjimui yra reikalingas žemas potencialas, tuo
35 tarpu kitame gale tam pačiam rezultatui gauti potencialas turi būti žymiai aukštesnis. CD arba DVD-nuskaitymo įrenginys sugeba lokalizuoti atspindinčius taškelius ir,

- atitinkamai, potencialas grandinėje gali būti išmatuojamas. Potencialo pokytis gali susidaryti dėl elektrocheminio proceso, vykstančio vienoje iš elektrocheminių celių. Pvz., elektrodas, padengtas cholesteroloksidaze, esant cholesteroliui, generuos vandenilio peroksidą. Vandenilio peroksidas pakeis elektros grandinės potencialą ir cholesterolis galės būti nustatomas kiekybiškai.
- 10 Norint iš tirpaus pavyzdžio pašalinti dideles daleles, pvz., ląsteles, dulkes ir t. t., gali būti naudojami filtrai. Filtrai dažniausiai yra įterpiami kaip pavyzdžio įvedimo bloko dalis. Filtrai gali būti padaryti iš akyto plastiko, stiklo, skersai susiūtos medvilnės arba
- 15 celiuliozės ir kt. Šios medžiagos gali būti stulpelio arba panašios formos, priklausomai nuo konkretaus atvejo. Plastikai, pvz., teflonas, gali būti naudojami plėvelės pavidalu.
- 20 Kadangi pavyzdžio ruošimo metu oligonukleotidų denatūravimui dažnai naudojami chaotropiniai agentai, yra tikslinga diske numatyti dializės priemonės, kad prieš atliekant tyrimą būtų pašalinta druska. Kaip parodyta 6 Fig., dializės mazgas yra paruošiamas, uždedant dializės
- 25 membraną 17 ant suformuoto diske sekcijos vienos arba abiejų pusių (viršaus ir apačios). Turint omeny mažus tūrius, buferio, kuris jau yra dializės membranos viduje, kiekis yra paprastai pakankamas ir nereikia buferio kitoje membranos pusėje, priešingoje skysčio sluoksniui.
- 30 Kolonėlė gali būti ruošiama taip, kaip parodyta 7 Fig., užpildant sekciją 18 reikiamu geliu, adsorbentu arba jonitu, pvz., silikageliu, Sefadeksu ir t. t. (konkrečiam atvejui yra parenkama konkreti medžiaga) ir kitame gale
- 35 uždedant filtrą 19. Potencialūs pavyzdžiai apima mažesnių molekulių atskyrimą nuo didesnių bei hidrofiliinių ir hidrofobinių junginių frakcionavimą. Jonitinė kolonėlė

ypač tinka nukleino rūgščių atskyrimui nuo kitų biomolekulių. Kolonėlės savaime tinka kitiems pritaikymams, kurie gali būti naudingi arba būtini, atliekant bet kurį konkretų tyrimą.

5

8 Fig. iliustruoja vožtuvą, pažymėtą kaip 20, kuris gali būti patalpintas viename kolonėlės arba reakcijos konteinerio gale, turinčiame du išleidimo kapiliarus 21 ir 22. Be to, čia yra du elektrodai, 23 ir 24, kurie iš pradžių nėra įkrauti (parodyta pozicija), ir laidi metalo folija 25, kuri yra pritaikyta uždaryti vieną arba kitą kapiliarą, priklausomai nuo padėties kapiliare. Metalų folija yra taip sukonstruota, kad uždaro vieną kapiliarą, kada nebėga elektros srovė, bei atidaro anksčiau uždarytą kapiliarą ir uždaro kitą kapiliarą, kada elektros srovė teka. Kaip pavyzdys, vožtuvas yra padarytas iš plonos aukso folijos, kuri mechaniškai prispaudžiama priešais kitą ištekėjimo kapiliarą ir pajungiama prie artimiausio elektrodo. Kada baterija suaktyvinama, aukso folija yra atstumiamą nuo artimiausio elektrodo ir pritraukiama kito elektrodo. Tokiu būdu, aukso folija yra spaudžiama prie kitos išleidimo angos. Gali būti naudojamos kitų laidžių metalų folijos, bet daugeliui operacijų yra tinkamiausias laidus ir nerūdijantis metalas. Baterija gali būti dezaktyvuojama, kaip aiškinta anksčiau, ir tada vožtuvas perjungiamas atgal į pradinę padėtį.

CD-R arba CD-RW-tvarkyklių lazeris turi iki 10 mW galingumą, tai leidžia įkaitinti objektus iki aukštų, net iki 600°C, temperatūrų. Galingumas yra pakankamai didelis, kad padarytų skylės įvairiose medžiagose, įskaitant plastiką. Plastiką privalo turėti dažą, kuris absorbuoja lazerio šviesą. Grįžtamajam uždarymui gali būti naudojamas terminis išplėtimas. Pvz., bimetalinių folijų junginys yra labai jautrus temperatūrai.

Vožtuvu gali būti naudojamas pjezoelektrikas. Taip pat pjezoelektriškumas gali būti naudojamas matuojant ypač mažus skysčių tūrius, pvz., pavyzdžio nanolitrai gali būti padalinami skirtingiems tyrimams.

5

Vožtuvo funkcijai panašios operacijos gali būti vykdomos cheminiu būdu - iš tirpalo nusodinant kietą cheminį junginį ir/arba ištirpinant nuosėdas. Pirmoji tokio vožtuvo išleidimo anga yra uždaroma, nusodinant cheminį junginį kapiliare. Tas junginys gali būti, pvz., sidabro chloridas. Chlorido jonų gali būti pagrindiniame skysčio sraute, kai tuo tarpu atskiruose šoniniuose kapiliaruose yra grynas vanduo bei sidabro nitratas vandenyje. Šoniniai kapiliarai turi tokią konfigūraciją, kad pirmiausia vanduo ir po to sidabro nitratas patenka į pagrindinį skysčio srautą, kuriame yra chlorido. Tuo momentu, kada sidabro jonai pasiekia sekcijų susikirtimą, kapiliaras yra užkemšamas, veikdamas kaip uždaromasis vožtuvas. Priešingai, iš pradžių kapiliaras gali būti užkimštas tirpaus junginio nuosėdomis, pvz., natrio chloridu. Kapiliaro natrio chlorido kamštis ištirpinamas ir kapiliaras atidaromas, pridėjus bet kokio vandeninio tirpalo.

Pageidautina tyrimo bloką naudoti tyrimo vietoje. Trumpai, tyrimo blokas (13 Fig.) apima skaldymo tarpininką 26, kovalentiškai vienu galu 27 prisijungusį prie disko paviršiaus 28, o kitu galu 29 - prie perdavimo elemento 30. Čia aprašyti optimalūs perdavimo elemento variantai apima atspindinčias aukso sferas arba neskaidrias latekso sferas. Taip pat yra du atpažinimo elementai 31a, 31b, vėliau minimi kaip atšakos, kurie kovalentiškai prisijungę prie kiekvieno tarpininko tokio būdu, kad viena atšaka yra prijungta tarpininko skaldymo vietoje 32 prie kiekvienos pusės. Čia aprašyti optimalūs atšakų variantai apima oligonukleotidus, antikūnus ir oligonukleotidų-antikūnų konjugatus. Tyrimo blokai gali

būti naudojami analitės buvimui detektuoti ir gauti jos signalą ir teigiamo, ir neigiamo atpažinimo fakto atveju (14 Fig.). Teigiamas atpažinimo faktas (14A, C ir E Fig.) yra tada, kada analitė 33 prisiriša prie abiejų atšakų 3la ir 3lb, sudarydama jungiamosios kilpos 34 komplektą tarp tarpininko, padalyto skaldymo vietos 32, dviejų pusių. Neigiamas atpažinimo faktas (14B, D ir F Fig.) yra tada, kada analitė 33 prisiriša tiksliai prie vienos arba nei prie vienos atšakų 35a, 35b ir todėl nesusidaro kilpa, sujungianti dvi tarpininko puses. Kada teigiamas atpažinimo faktas yra lydimas tarpininkų skaldymo, ryšys nuo disko į perdavimo elementą pasilieka nepažeistas (14E Fig.). Iš kitos pusės tarpininkų skaldymas tyrimo bloke, lydimas neigiamo atpažinimo fakto, perdavimo elementuose sąlygoja atsijungimą nuo disko (14F Fig.). Tokiu būdu, neigiami atpažinimai baigiasi perdavimo elementų atpalaidavimu, ir jie yra lengvai pašalinami, tuo tarpu teigiamas atpažinimas baigiasi tuo, kad perdavimo elementai pasilieka savo tam tikruose tyrimo sektoriuose. Bet koku atveju rezultatai gali būti nedelsiant stebimi CD-ROM arba DVD nuskaitymo įrenginyje.

Čia aprašyti papildomi išradimo variantai, kur naudojamos atspindinčios arba neskaidrios perdavimo molekulės, ir teigiami ir/arba neigiami atpažinimo fakto testai atliekami plačiame galimų tyrimų diapazone. Pvz., kai kuriuose tyrimuose atšakos gali būti sujungtos prieš įdedant pavyzdį ir analitės surišimas atjungia atšakas. Šiuo atveju teigiamas atpažinimo faktas baigiasi perdavimo elemento išnykimu, kai tuo tarpu neigiamas atpažinimo faktas baigiasi perdavimo elemento užlaikymu.

Kiti čia aprašyti tyrimo reakcijos variantai neturi skaldymo tarpininkų su atšakomis. Vienoje tokioje alternatyvioje scheme IBCD paviršius gali būti padengtas metalu, pageidautina auksu, ir analitė susijungia su neskaidriom dalelėm, pvz., latekso

rutuliukais arba su nudažytomis liposomomis metalo paviršiuje.

Neskaidrios sferos tyrimo blokuose

5

Ankstesni tyrimo blokai rėmėsi atspindinčių dalelių susirišimu su permatomu IBCD paviršiumi. Situacija gali būti taip pakeista, kad neskaidrios dalelės bus prijungtos prie atspindinčio paviršiaus. Šis sprendimas
10 yra ypač naudingas, kada tiriamos didelės ląstelės ir tai pavaizduota 12 Fig.

Ant plastiko paviršiaus yra nusodinama metalinė plėvelė. Informacija gali būti užšifruojama šiame metalo
15 sluoksnyje, kaip yra įprastiniuose CD. Ši informacija gali apimti padėties adresus bei kitą su tyrimu susijusią informaciją. Toliau metalinis sluoksnis yra padengiamas plastikiniu sluoksniu. Po to šis yra amininamas, kaip aprašyta anksčiau, vietoj aukso sferų prie substrato per
20 tarpininko molekules yra prijungiamos didelės latekso sferos (10-50 μm skersmens), turinčios dažų. Šios latekso sferos yra dalinai padengtos atpažinimo molekulėmis, kaip aprašyta aukso sferų atveju anksčiau. Atpažinimo ląstelės suriša latekso sferas su substratu,
25 net jei tarpininkas yra suskaldytas, ir dažas, esantis sferoje, neleidžia lazerio šviesai atsispindėti nuo metalo paviršiaus. Priešingai, jei naudojamas tinkamas fluorescencinis dažas ir tinkamas lazerio šviesos bangos ilgis, sferų fluorescencinė emisija gali būti naudojama
30 tyrimo kontrolei. Tam būtinas specializuotas įtaisas ir uždavinys gali būti palengvintas naudojant mėlynuosius lazerius, kada jie bus prieinami CD-ROM arba DVD nuskaitymo įrenginiuose.

35 Paprasčiausioje ląstelių detekcijos tyrimo versijoje latekso sferos nėra sujungtos su IBCD prieš tyrimą, bet

yra įvedamos po to, kai ląstelės susijungia su IBCD. Sudedama latekso sferų suspensija, atpažinimo molekulės ant sferų prisijungia prie tinkamų ląstelių ir šios ląstelės yra imobilizuojamos. Tada šios latekso sferos gali būti stebimos dėl sumažėjusio atspindėjimo CD-ROM arba DVD nuskaitymo įrenginyje.

Komplementarus tarpininkų surišimas

10 Viena kliūtis tarpininko kovalentiniam surišimui yra tai, kad diskas sunkiai regeneruojamas po tarpininko suskaldymo. Jeigu vietoje to tarpininkai yra prijungiami prie substrato su komplementariaisiais oligonukleotidais, diskas gali būti regeneruojamas po tyrimo užbaigimo. Tarpininkai arba jų liekanos yra pašalinami kaitinant arba naudojant chaotropinius agentus. Dupleksai, surišantys tarpininkus, yra denatūrizuojami ir diskas gali būti nuvalomas. Diskas užlaiko oligonukleotidus, kurie yra prijungę senus tarpininkus. Visi oligonukleotidai vienoje tyrimo vietoje yra identiški. Jie gali būti skirtingi skirtingose tyrimo vietose arba identiški visame IBCD. Yra pridėdama naujų tarpininkų, turinčių oligonukleotidus komplementarius su esančiais IBCD. Po inkubacijos tarpininko komplementarūs oligonukleotidai ir IBCD hibridinami. Tarpininkų perteklius pašalinamas. Šiuo atveju oligonukleotidų atšakos gali būti prijungiamos prie tarpininkų prieš tai, kai tarpininkai yra surišami su paviršiumi. Po to pridėdama aukso sferų, jos surišamos tarpininkų tiolinėmis grupėmis arba disulfidiniais tilteliais, ir diskas vėl paruoštas naudojimui.

Kiuvetė yra naudojama UV/Vis spektrofotometriniuose, fluorescencijos arba chemiliuminescenciniuose tyrimuose. BCD kiuvetė iš esmės yra kapiliaras, kuris yra patalpintas tarp šviesos šaltinio ir fotodetektoriaus. Šviesa gali būti reguliuojama veidrodžiais ir bangų

kreiptuvais. BCD kiuvečių kiekis svyruoja nuo 0 iki 10000, geriausiai nuo 0 iki 50 vienam tyrimo sektoriui. Į daugumą kiuvečių pavyzdys patenka per pavyzdžio ruošimo kamerą. Šios kameros gali turėti iš anksto patalpintus reagentus arba reagentai yra laikomi atskirose kamerose ir su pavyzdžiu sumaišomi tuomet, kai jis patenka į pavyzdžio ruošimo kamerą. Pavyzdys ir reagentai gali būti pakaitinami elektros pagalba, infraraudonaisiais spinduliais, kurie yra generuojami fotodiodo. Po inkubacijos periodo pavyzdys perduodamas į kiuvetę. Transmisinė arba emisinė šviesa yra matuojama fotodetektoriumi. Šiame išradime naudingiausia, kai fotodetektorius yra CD arba DVD tvarkyklės viduje.

Spektrofotometriniams tyrimams tinkamiausi šviesos šaltiniai yra fotodiodai arba puslaidininkiniai lazeriai. Galima naudoti CD arba DVD tvarkyklių šviesos šaltinį. Tačiau šiuo metu šie prietaisai naudoja tiksliai vieną bangos ilgį, kuris atitinka infraraudonąją arba raudonąją šviesą. Jei naudojamas CD arba DVD tvarkyklių vidinis šviesos šaltinis, 15 Fig. fotodiodas arba lazeris yra pakeičiamas veidrodžiu. Nors naudojant infraraudonąją arba raudonąją šviesą gali būti atliekami įvairūs tyrimai, daugumai tyrimų naudinga naudoti papildomus šviesos šaltinius. Pvz., gali būti specialiai sukonstruota eilė fotodiodų, kad jie generuotų raudoną, geltoną, žalią ir mėlyną šviesas. Įmanoma sukonstruoti fotodiodą bet kokiam bangos ilgiui ir, atitinkamai, fotodiodų skaičius gali siekti 300, kad būtų apimtas visas UV/matomos šviesos spektras. Lazerių galingumas yra didesnis ir geriau fokusuojamas negu fotodiodų, todėl jie yra tinkamesni. Ypač mikroertminiai ir nanodotiniai lazeriai pasižymi mažumu ir jie gali būti taip sukonstruoti, kad emituotų vos ne bet kokį bangos ilgį. Šviesos šaltinis gali būti sukonstruotas kaip modulis, kuris gali būti įtaisomas ant disko prieš ir pašalinamas po IBCD panaudojimo.

Pavienės operacijos

Toliau yra aprašomos pavienės operacijos:
5 centrifugavimas, filtravimas, skysčių perdavimas, skysčių sumaišymas, dializė, frakcionavimas kolonėlėse, kaitinimas, šaldymas, elektrokonvekcija ir elektroforezė.

Išcentrinė jėga yra pagrindinė jėga, naudojama skysčių
10 perdavimui IBCD. Ji taip pat gali būti naudojama centrifugavimui, kuris yra svarbus atskiriant ląsteles iš plazmos. Šiuo atveju yra naudinga įterpti filtrą pavyzdžio priėmimo konteineryje.

15 Skysčių perdavimo operacijoje yra svarbu eiliškumas ir veiksmų atlikimo momentas. Kad užtikrinti tinkamą eiliškumą pristatant į tam tikros reakcijos vietą, gali būti sudaryti skysčių rinkiniai, kaip parodyta 9 Fig. Viename variante numatyti du pagrindiniai kapiliarai, 36
20 ir 37, kuriais skystis gali tekėti per jungiamuosius kapiliarus 38, 39 ir 40. Vienas iš pagrindinių kapiliarų yra oro kanalas, kuriuo gali tekėti ir skystis ir kuris paprastai yra hidrofobinis. Kitas pagrindinis kanalas pristato reagentus skystame pavidale ir yra hidrofilinis.
25 Jungiantieji kapiliarai ir apjungtos ertmės gali tarnauti reagentų saugyklomis (pažymėta 41, 42 ir 43), nekeičiant jų išsidėstymo viena kitos atžvilgiu. Skysčio sekcija, į kurią jie yra nukreipiami, ir pristatymo momentas yra kontroliuojami jų atitinkamais išdėstymais, kapiliarų
30 dydžiu, skysčių tankiu ir klampumu bei disko sukimosi greičiu. Skysčiai atskiriami mažų oro burbuliukų pagalba, kad būtų išvengta susimaišymo, nebent susimaišymas pageidautinas. Kad išvengti slėgio gradientų, oro kapiliarai su visais skysčių kapiliarais sujungiami prieš
35 srovę. Be to, skysčių apsaugai nuo patekimo į oro kapiliarus pastarieji būna hidrofobiniai.

Dviejų tirpalų sumaišymas atliekamas sujungiant du kapiliarus į Y formos darinį. Jau vien tai užtikrina gerą tirpalų susimaišymą. Kad garantuoti dar efektyvesnį susimaišymą, kapiliaras gali turėti mažus periodinius
5 praplatėjimus toje dalyje, kuri yra po sujungimo. Reikia pažymėti, kad IBCD sukimasis užtikrina efektyvų tirpalų sumaišymą konteineriuose.

Dializės metu skystis kontaktuoja su membrana, turinčia
10 buferį. Membranos molekulinės masės ribos gali būti nuo 300 iki 500000 daltonų. Kadangi tikrai labai plonas skysčio sluoksnis kontaktuoja su dializės membrana, dializė vyksta labai greitai. Tačiau skysčio ir buferio santykis yra tikrai tarp 1:10 ir 1:100, todėl dializė
15 nėra kiekybinė. Daugeliu atvejų šito pilnai pakanka.

Visiškai įmanomos yra gelių adsorbcijos ir jonų mainų chromatografijos. Chromatografinės terpės pagalba yra frakcionuojamos įvairios molekulių rūšys ir jos išeina
20 kapiliarais atskirai, kaip įprastinės chromatografijos metu. Naudojant vožtuvą, atskiros frakcijos gali būti atskiriamos ir nukreipiamos į tyrimo bloką.

Kaitinimą geriausia atlikti elektros pagalba. Viršutinis
25 ir apatinis elektrodai yra atskirti 500 μm tarpu. Jei tirpalas turi jonų, sistema užsitrumpina ir vyksta kaitinimas. Kaitinimą galima nutraukti, pašalinus jonus iš baterijos arba iš konteinerio. Įjungus į grandinę termostatą, gali būti pasiekama pastovi temperatūra.
30 Labai paprastas termostatas yra bimetalinis elementas, kuris gali sujungti elektros grandinę, esant žemesnei temperatūrai, ir išjungti, esant aukštesnei temperatūrai. Kitoks kaitinimo mechanizmas yra numatytas su lazeriu CD arba DVD-tvarkyklėse. Ypač CD-R-tvarkyklės turi galingus
35 lazerius. Taip pat ertmės viršus arba dugnas gali turėti skystų kristalų plėvelę, kuri, jei tai būtina, yra

izoliuota permatomu sluoksniu. Kitoje ertmės pusėje yra atspindintys sluoksnis. Kada ertmės temperatūra yra žemesnė už pagrindinę virsmo temperatūrą, skystas kristalas išbarstys šviesą ir atspindėjimas nebus stebimas. Esant temperatūrai aukštesnei už virsmo temperatūrą, šviesa yra atspindama atgal ir kaitinimas gali būti nutraukiamas, ir yra mažiau efektyvus. Šaldymas geriausiai atliekamas endoterminio ištirpinimo pagalba, t. y., naudojantis šilumos absorbcija, tirpstant medžiagai. Šaldomasis tirpalas ir tirpalas, kuris bus šaldomas, turi būti atskirti plona aliuminio, vario, sidabro arba aukso plėvele. Šaldymas gali būti atliekamas, pasyviai atšaldant oru. Šiuo būdu atšaldoma tik iki kambario temperatūros, bet daugeliu atvejų to pilnai pakanka. Šaldymas ir kaitinimas taip pat gali būti atliekami ciklais vienoje ertmėje, arba nuoseklia seka besikaitaliojančiose kaitinimo ir šaldymo ertmėse. Tai leidžia PCR-amplifikacijas atlikti IBCD viduje.

Konkrečiais atvejais gali būti pritaikyta elektrokonvekcija, elektroforezė ir izoelektrinis fokusavimas. Elektrokonvekcijos atveju medžiaga yra perduodama, nebandant jos išskirstyti į komponentus. Elektroforezėje atskyrimas yra pagrindinis tikslas. Atskyrimas yra palengvinamas, naudojant gelį, kuris trukdo vykti konvekcijai. Kadangi atstumai yra maži, esamo lauko stiprumo pakanka, kad vyktų elektroforezė. Dėl tos pačios priežasties frakcionavimui būtinas laikas yra gana trumpas ir gali trukti 1-5 min., arba net mažiau nei 1 min. Sėkminga elektrokonvekcija gali būti atlikta per keletą sekundžių. Izoelektrinis fokusavimas iš esmės yra elektroforezė pH gradientu. pH gradientas gali būti sudaromas, naudojant eilę lygiagrečių kapiliarų, kurių kiekvienas turi skirtingą buferį, kad pH keistųsi laipsniškai. Tai parodyta 16 Fig. Didžioji buferio dalis išsilaikys kapiliaruose ir tai užtikrins pH gradiento buvimą izoelektrinio fokusavimo metu. Pasibaigus

fokusavimui, komponentai gali judėti išilgai kapiliarų dėl išcentrinės jėgos poveikio arba gali būti atlikta ortogonalinė (stačiakampė) elektroforezė. Šis metodas užtikrina beveik pilną žmogaus plazmos proteinų frakcionavimą (Anderson, Tracy and Anderson, "The Plasma Proteins", 2nd Ed., Vol. 4, Academic Press, Inc., 1984).

Ypatingai palankus tyrimo vietų išdėstymas parodytas 10 Fig. Tyrimo blokas turi tarpininko molekules ir atspindinčias sferas, kaip aprašyta anksčiau, bet jos taip išdėstytos linijine tvarka, kad gali būti patogiai lokalizuotos viename arba keliuose kapiliaro kanalėliuose disko tyrimo vietoje. Kaip aprašyta, analizė prisiriša prie tarpininko molekulių, kurios turi atšakas, jautrias arba komplementarias analitei (kaip numatyta A atveju) ir po nuplovimo analizė, kuri yra surišta, yra lokalizuota specifinėse padėtyse (kaip parodyta B atveju). Surištų analičių buvimas nustatomas, pasinaudojant įprastiniu padėties adreso nustatymu disko nuskaitymo įrenginio ir asocijuotos programinės įrangos pagalba, kaip buvo aprašyta.

1 pavyzdys

25 Oligonukleotidų analizės tyrimų blokas (2 Fig., Tyrimų blokas)

Pavyzdys, turintis DNR, sumaišomas su natrio dodecilsulfatu, kad būtų lizuojamos ląstelės. Šis tirpalas paduodamas į konteinerį, pažymėtą "Pavyzdžio įvedimas" ir diskas pradeda suktis. Pavyzdys filtruojamas ir sumaišomas su komplementariųjų oligonukleotidų mišiniu. Šie oligonukleotidai yra komplementarūs tiems oligonukleotidams, kurie bus analizuojami, ir taip pat turi tiolio grupę viename gale. Hibridizacija atliekama konteineriulyje, pažymėtame "Pavyzdžio ruošimas". Šis konteineris gali būti kaitinamas (Fig. neparodyta). Pasibaigus atitinkamai inkubacijai, diskas pasukamas. Kai

pavyzdys perduodamas į konteinerį, pažymėtą "Pavyzdžio ruošimas", jis sumaišomas su nukleazės S tirpalu, paduotu iš šoninio kapiliaro. Mišinys paliekamas inkubuotis. "Pavyzdžio atskyrimas" konteineryje, kuris turi du aukso
5 elektrodus ir vožtuvą, kaip parodyta 8 Fig. Žemutinis elektrodas padengtas tarpininkais, turinčiais galines izotiocianato grupes. Jos prisijungia prie tiolų turinčių oligonukleotidų, kurių keletas yra hibridizuoti su pavyzdžiu. Visos nesusihibridizavę DNR dalys yra
10 suskaldomos ir nuplaunamos. Tada baterija tampa funkcionali. Tai reguliuojama greičio, kuriuo rūgštis ir vario jonai suteka į neapkrautą bateriją. Konteineris kaitinamas, surišti oligonukleotidai atsilaisvina ir vožtuvas persijungia.

15 Oligonukleotidai plūsteli į tyrimų plotą. Po atitinkamos inkubacijos tyrimų plotą pasiekia ligazė ir, jei pavyzdys turi tinkamą oligonukleotidą, ant tarpininko molekulės esančios dvi atšakos susijungia. Labilūs tarpininkai yra
20 nukerpami. Jei tarpininkai turi siloksano grupes, nukirpimas atliekamas pridėdant fluorida jonų. Laisvos aukso sferos nuplaunamos dideliu greičiu sukančiomis IBCD. Nuskaitymas gali būti atliekamas nedelsiant.

25 2 pavyzdys

Ląstelių ir virusų nustatymo tyrimų blokas

Alternatyviniai tyrimų bloko variantai, aprašyti čia, yra naudojami, nustatant virusines ir bakterines daleles,
30 ląsteles ir kitas daleles, kurios yra didesnės negu oligonukleotidai, antikūnai ir kt., aprašyti anksčiau. Virusai paprastai yra beveik sferinės dalelės, turinčios skesmenį, mažesnį negu 0,5 μm . Bakterijos yra arba sferinės arba lazdelės formos. Jų didžiausios dimensijos
35 neviršija 2 μm , išskyrus flageliatus ir kitas panašias išorines struktūras (siūlelinius). Šie patogenai yra

mažesni arba maždaug to paties dydžio, kaip ir aukso sferos, naudojamos jų nustatymui, ir jų sąveika su dvejomis tarpininko atšakomis gali būti apribota. Dėl šios priežasties šios atšakos susijungia su IBCD paviršiumi ir aukso sfera vietoj tarpininko, kaip parodyta 11 Fig. Aukso sfera prisijungia prie tarpininko molekulės 45 viename tarpininko molekulės gale, o kitas tarpininko galas yra prijungtas prie substrato 46 paviršiaus. Tarpininko molekulėje yra tipiška skaldymo vieta 47, pvz., siloksano grupė, kaip aprašyta anksčiau. Priešingai anksčiau aprašytiems variantams, kur atšakos yra prisijungę prie tarpininko molekulės tarp substrato ir skaldymo vietos bei aukso sferos ir skaldymo vietos, čia atšakos yra prisijungę prie aukso sferos ir substrato paviršiaus. Tai iliustruoja 11 Fig., kur oligonukleotidai 48 ir 49 prisijungę prie substrato paviršiaus, o oligonukleotidai 50 ir 51 yra prisijungę prie aukso sferos paviršiaus. Po to komplementarūs oligonukleotidai konjuguoti su specifinės surišančios poros elementais, pažymėtais 52, 53, 54 ir 55, pridedami prie oligonukleotidų ant substrato ir aukso sferų, kaip tai parodyta brėžinyje. Tai sudaro didesnę erdvę ląstelėms jungtis su antikūnais ir kitomis atpažinimo molekulėmis.

Kiekvienas tarpininkas vis dar turi mažiausiai vieną skaldymo sritį. Visais aspektais jos yra identiškos tomis, kurios aprašytos anksčiau, išskyrus tai, kad neturi prijungtų atšakinių molekulių. Jeigu, pvz., ląstelė patenka į tyrimų vietą, ir ji turi grupes, kurios sudaro specifines surišančias poras su jų atitinkamais komplementariais elementais, tarp aukso sferos ir substrato susidaro jungiančioji kilpa. Kada tarpininko molekulė suskaldoma, aukso sfera pasilieka ant substrato ir ląstelės buvimas gali būti detektuojamas, kaip aprašyta anksčiau. Tačiau jei specifinės surišančios poros nesusidaro, suskaldžius tarpininką, aukso sfera nepasilieka prisirišusi prie substrato ir yra pašalinama.

Antikūnai ir kitos atpažinimo molekulės su substratu gali jungtis panašiu būdu, kuriuo yra prijungiami tarpininkai. Visi tarpininkai, esantys ant IBCD, yra identiški ir tuo pačiu metu yra prijungti prie paviršiaus amino grupių arba analogiškų aktyvių grupių. Maždaug pusė amino grupių yra naudojama tarpininkų prijungimui. Kita pusė yra naudojama atpažinimo molekulių prijungimui prie substrato. Jei visos ant IBCD paviršiaus esančios molekulės yra panašios, jos tuo pačiu metu gali būti prijungiamos kaip tarpininkai. Priešingu atveju, jei atpažinimo molekulės yra specifinės kiekvienai tyrimo vietai, jos gali būti paskirstytos lokaliai, naudojant kontaktinį spausdinimą, rašalinį spausdinimą arba mikrokapiliarinį nusodinimą.

Po to, kai aukso sferos prijungiamos prie tarpininko tiolio grupių, per tiolio grupes prie aukso sferų yra prijungiamos taip pat ir kitos atpažinimo molekulės. Šiuo tikslu šios atpažinimo molekulės pirmiausia yra konjuguojamos su tarpininku, turinčiu blokuotas tiolio arba amino grupes. Amino grupė gali būti transformuota ir įvesta tiolio grupė. Įvairios atpažinimo molekulės, sujungtinės su aukso sferomis, pasiskirsto panašiu būdu, kuriuo kitos atpažinimo molekulės yra sujungiamos su IBCD paviršiumi.

Atpažinimo molekulės gali būti oligonukleotidai. Šie oligonukleotidai toliau gali būti hibridizuojami su komplementarių oligonukleotidų biomolekulių konjugatais. Tai leidžia prijungti jautrias ir reaktyvias biomolekules, pvz., proteinų, turinčių keletą amino arba tiolio grupių.

Prie aukso sferų prijungtos atpažinimo molekulės gali difunduoti apie sferą, nors jos yra standžiai surištos. Ląstelė, kuri yra atpažinta abiem atpažinimo molekulėmis,

užbaigia jungiančiąją kilpą, kuri aukso sferą suriša su IBCD paviršiumi. Po tarpininko suskaldymo aukso sfera išlieka ir yra detektuojama CD-ROM arba DVD nuskaitymo įrenginiu.

5

Toje pačioje tyrimo vietoje gali būti naudojama daugybė skirtingų atpažinimo molekulių. Tokio sprendimo pranašumas yra tai, kad visi žinomi tam tikrų patogeno rūšių mutantai gali būti detektuojami vienoje tyrimo vietoje. Taip pat įvairūs mutantai gali būti nustatomi skirtingose tyrimo vietose, turinčiose specifines atpažinimo molekules.

IBCD yra universalus analizatorius. Jį yra lengva naudoti, ir jis savo progresyviausioje formoje talpina visus reagentus, o pridedamas vien tik pavyzdys. Jis gali būti naudojamas klinikinėse laboratorijose, ligoninėse, gydytojų kabinetuose ir namuose. Namuose surinkta informacija gali būti siunčiama į gydytojo kabinetą per internetą. IBCD gali būti sukonstruotas taip, kad kiekvieno paciento genetinis kodas būtų tikrinamas kiekvieną kartą. Pakanka apie 35 polimorfizmo taškų, kad kiekvienam asmeniui priskirti unikalų "brukšninį-kodą". Tai pašalina galimas klaidas, atsirandančias supainiojus mėgintuvėlius arba etiketes. Tyrimai, kurie gali būti atlikti, apima, bet neapsiriboja, imuninius tyrimus, DNR testus, ląstelių registravimą ir ląstelių formas matavimą, vėžinių ląstelių audinių pavyzdžiuose detekciją, kraujo chemiją ir elektrolitų analizę. Kiti pritaikymai liečia būsimų vaistų (vaistų-kandidatų) masės nustatymą, maisto ir aplinkos saugumo analizę, patogenų ir toksinų monitoringą mūsų lauke.

35

3 pavyzdys

Lipazės aktyvumo turbidimetrinis tyrimas

Reagentų ertmė talpina 15 μL stabilizuoto trioleino (250
5 μM) emulsijos, kurioje yra natrio deoksicholiato (30 mM)
ir CaCl_2 (100 μM), ištirpintų TRIS buferyje (pH 9,0, 25
mM). Pavyzdžio ruošimo kameroje yra liofilizuotos kiaulių
kolipazės (0,5 μg). Į pavyzdžio ruošimo kamerą yra
patalpinama du mikrolitrai serumo kartu su stabilizuotu
10 trioleinu ir kitais reagentais (naudojant 17 Fig.
parodytą aparatą). Vėliau dalis mišinio (5 μL) yra
perkeliamas į kiuvetę. Kadangi kapiliaro išėjimas eina
disko centro kryptimi, priešslėgis nutrauks tekėjimą.
Absorbancija prie 340 nm yra nuskaityama su vienos minutės
15 intervalais. $\Delta A/\text{min.}$ yra lipazės aktyvumo matas.

Nors šis išradimas aprašytas atsižvelgiant į kai kuriuos
specifinius variantus, suprantama, jog jo papildomos
modifikacijos ir ekvivalentai bei jų pakeitimai bus
20 aiškūs specialistams ir sudaro išradimo apibrėžties
turinį.

25

30

35

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Optinis diskas, tinkamas nuskaitymui lazerinio nuskaitymo įrenginio pagalba, b e s i s k i r i a n t i s
5 tuo, kad turi pirmąjį sektorių, turintį iš esmės savarankiškas tyrimo priemones analitės, numanomos, jog ji yra pavyzdyje bent vienoje iš anksto nustatytoje vietoje, surišimui arba reagavimui; nebūtinai, antrąjį sektorių, turintį kontrolines priemones, skirtas tyrimo
10 atlikimui ir analitės padėties informacijos dėl vienos arba daugiau analičių, numanomų esant pavyzdyje, patekimui į nuskaitymo įrenginį, ir kur analitės buvimas arba nebuvimas minėtoje padėtyje yra nustatomas nuskaitymo įrenginiu, naudojant kontrolines priemones ir
15 padėties informaciją, ir pavyzdžio įvedimo angą.

2. Optinis diskas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad pavyzdžio įvedimo anga yra per skystį sujungta su tyrimo priemonėmis.

20

3. Aparatas tyrimams atlikti, turintis optinį diską, lazerinį nuskaitymo įrenginį ir informacijos procesorių, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad diskas turi pavyzdžio įvedimo angą, pirmąjį sektorių, turintį iš
25 esmės savarankiškas tyrimo priemones analitės, numanomos, jog ji yra pavyzdyje bent vienoje iš anksto nustatytoje vietoje pirmajame sektoriuje, ir, nebūtinai, antrąjį sektorių, turintį kontrolinę informaciją tyrimo atlikimui ir analitės padėties informacijos, dėl vienos arba
30 daugiau analičių, numanomų esant pavyzdyje, pateikimui į nuskaitymo įrenginį ir apdorojimui informacijos procesoriumi, kur diskas yra tinkamas nuskaitymui lazeriniu nuskaitymo įrenginiu, o informacijos procesorius yra adaptuotas nustatyti analitės buvimą arba
35 nebuvimą minėtoje padėtyje, naudojant kontrolinę informaciją ir padėties informaciją.

4. Aparatas pagal 3 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad nuskaitymo įrenginys yra pritaikytas apjungti su informacijos procesoriumi.

5

5. Aparatas pagal 4 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad informacijos procesorius yra personalinis kompiuteris.

10 6. Diskas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad tyrimo priemonės turi skysčių laikymo priemonės ir skysčių perdavimo priemonės, suformuotas ant disko paviršiaus.

15 7. Diskas pagal 6 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad skysčių perdavimo priemonės turi kapiliarus.

8. Diskas pagal 6 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad skysčių perdavimo priemonės turi vožtuvą.

20

9. Diskas pagal 6 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad diskas turi elektrocheminės energijos priemonės.

10. Diskas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s
25 tuo, kad tyrimo priemonės turi pavyzdžio įvedimo angą, pavyzdžio ruošimo sektorių, analitės atskyrimo sektorių ir tyrimo sektorių, kur yra lokalizuota analitė.

11. Diskas pagal 6 punktą, b e s i s k i r i a n t i s
30 tuo, kad skysčių perdavimo priemonės reaguoja į išcentrinę jėgą arba į elektros lauką.

12. Diskas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s
35 tuo, kad diskas turi daug pirmųjų sektorių, tinkamų analizuoti daugelį analičių.

13. Diskas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s
tuo, kad papildomai turi daug pirmųjų sektorių, tinkamų
analizuoti tą pačią analizę arba skirtingas analites, kur
kiekvienas iš minėtų daugybės sektorių yra tinkamas
5 sujungimui per skystį su pavyzdžio įvedimo anga.

14. Tyrimo blokas, turintis substratą, galintį surišti
oligonukleotidus, ir tarpininko molekules, galinčias
jungtis prie oligonukleotidų, b e s i s k i r i a n t i s
10 tuo, kad turi pirmąją oligonukleotidą, surištą su
substratu, tarpininko molekulę, sujungtą pirmuoju galu su
pirmuoju oligonukleotidu antrojo oligonukleotido, kuris
yra komplementarus pirmajam oligonukleotidui pagalba, kur
tarpininko molekulė papildomai turi priemones prisijungti
15 prie analizės pavyzdyje, ir turi antrąją galą, kuris gali
būti nustatomas detekcijos priemonėmis, tarpininko
molekulei, papildomai turint tarpinę dalį tarp pirmo ir
antro galų, kuri gali būti skaldoma, prisijungimo
priemones, turinčias pirmąją grupę tarp tarpininko
20 molekulės pirmojo galo ir skaldymo vietos, skirtą
prisijungti prie analizės pirmosios dalies, ir antrąją
grupę tarp tarpininko molekulės antrojo galo ir skaldymo
vietos, skirtą prisijungti prie analizės antrosios
dalies, kur skaldymo vieta gali būti skaldoma, chemiškai
25 nepaveikiant analizės prisijungimo srities.

15. Tyrimo blokas, tinkamas nuskaitymui CD-ROM arba DVD
nuskaitymo įrenginiu, b e s i s k i r i a n t i s tuo,
kad turi optinį diską, turintį pavyzdžio įvedimo angą ir
30 iš esmės savarankiškas tyrimo priemones diske analizės,
numanomos, jog ji yra pavyzdyje bent vienoje iš anksto
nustatytoje vietoje ant disko, surišimui, ir priemones
minėtoje vietoje, skirtas nustatyti analizės nebuvimą
arba buvimą, naudojant CD-ROM arba DVD nuskaitymo
35 įrenginį.

16. Optinis diskas, tinkamas nuskaitymui CD-ROM arba DVD nuskaitymo įrenginiu, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad turi pavyzdžio įvedimo angą, iš esmės savarankiškas tyrimo priemonės lokalizuoti analitei, numanomai, jog ji
5 yra pavyzdyje bent vienoje iš anksto nustatytoje vietoje ant disko, ir priemonės minėtoje vietoje, skirtas nustatyti analitės nebuvimą arba buvimą, naudojant CD-ROM arba DVD nuskaitymo įrenginį.
- 10 17. Optinis diskas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad lazerinis nuskaitymo įrenginys yra CD-ROM arba DVD diskinis nuskaitymo įrenginys.
- 15 18. Aparatas pagal 3 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad lazerinis nuskaitymo įrenginys yra CD-ROM arba DVD diskinis nuskaitymo įrenginys.
- 20 19. Tyrimo blokas, turintis substratą, galintį surišti oligonukleotidus, ir tarpininko molekules, galinčias jungtis prie oligonukleotidų, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad turi pirmąjį oligonukleotidą, surištą su substratu, tarpininko molekulę, pirmuoju galu sujungtą su pirmuoju oligonukleotidu antrojo oligonukleotido, kuris yra komplementarus pirmajam oligonukleotidui pagalba, kur
25 tarpininko molekulė papildomai turi priemonės prisijungti prie analitės pavyzdyje, ir turi antrąjį galą, kuris gali būti nustatomas detekcijos priemonėmis, tarpininko molekulėi, papildomai turint tarpinę dalį tarp pirmo ir antro galų, kuri gali būti skaldoma, prisijungimo
30 priemonės, turinčias pirmąją grupę tarp tarpininko molekulės pirmojo galo ir skaldymo vietos, skirtą prisijungti prie analitės pirmosios dalies, ir antrąją grupę tarp tarpininko molekulės antrojo galo ir skaldymo vietos, skirtą prisijungti prie analitės antrosios
35 dalies, kur skaldymo vieta gali būti skaldoma nepriklausomai nuo analitės.

FIG. 1

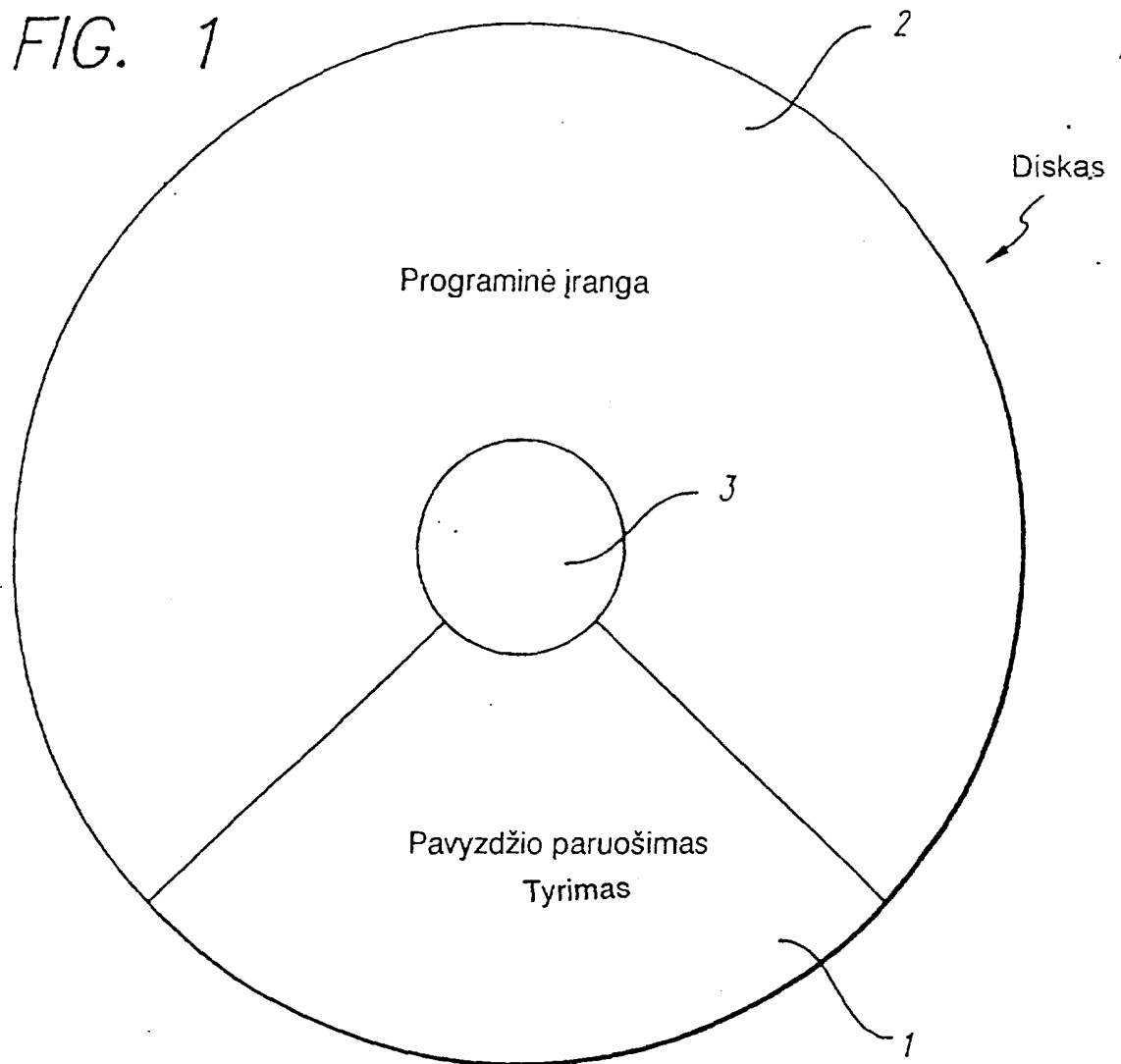


FIG. 2A

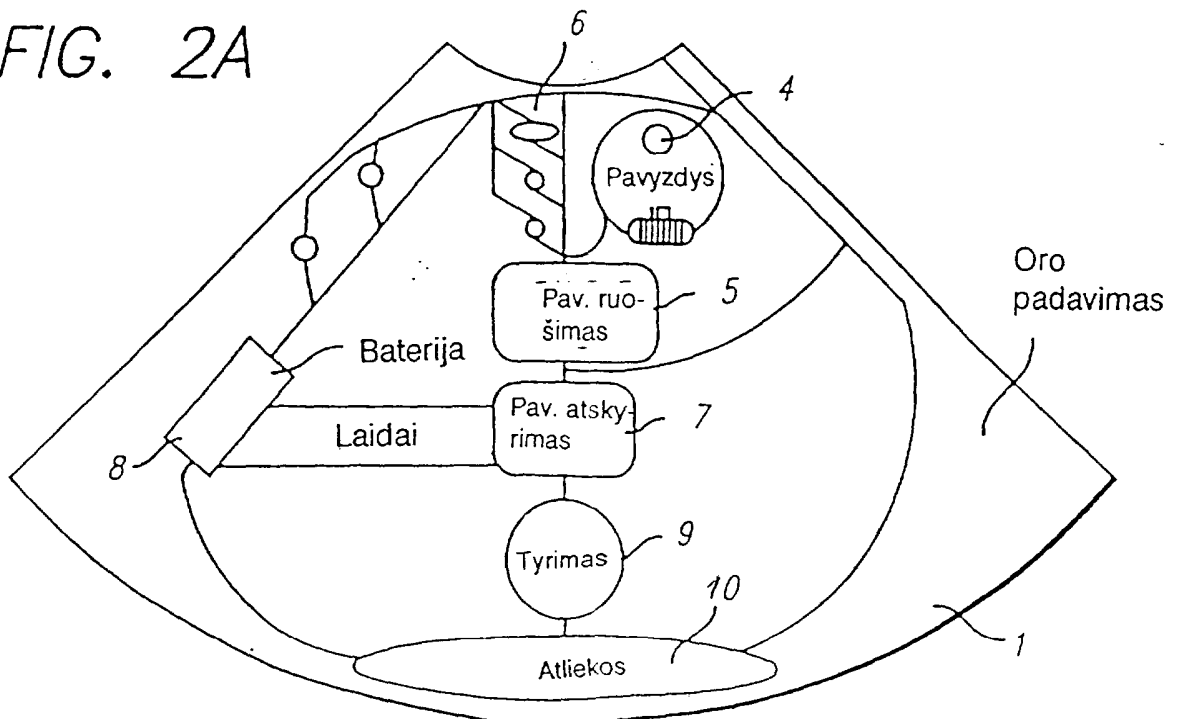


FIG. 2B

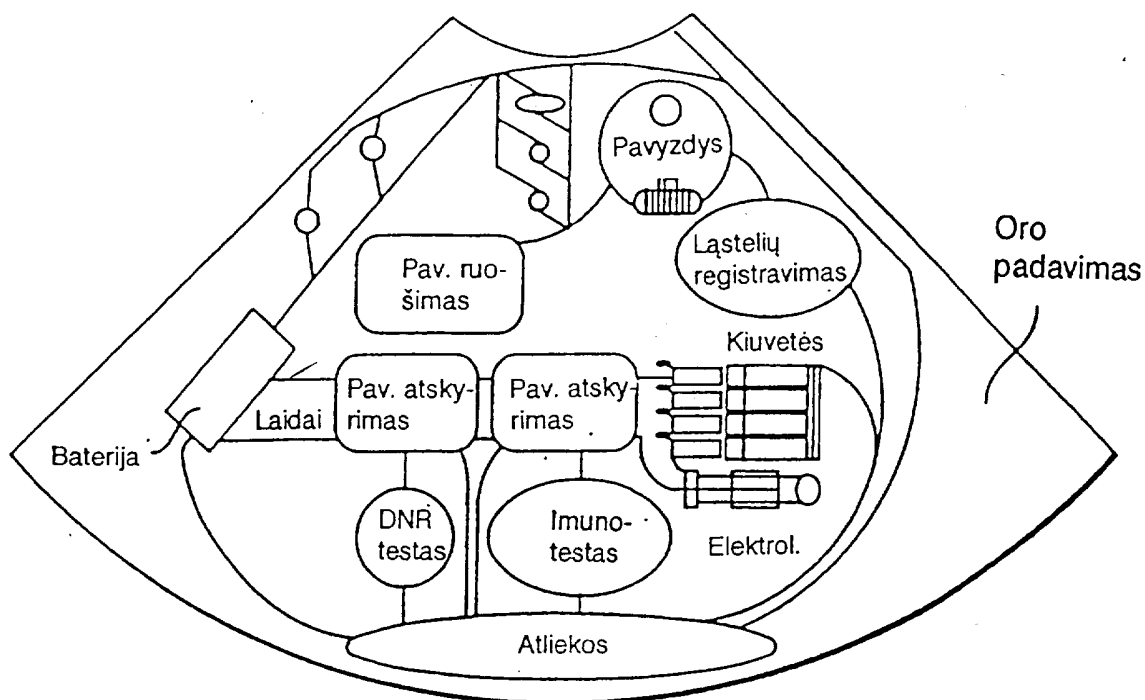


FIG. 3

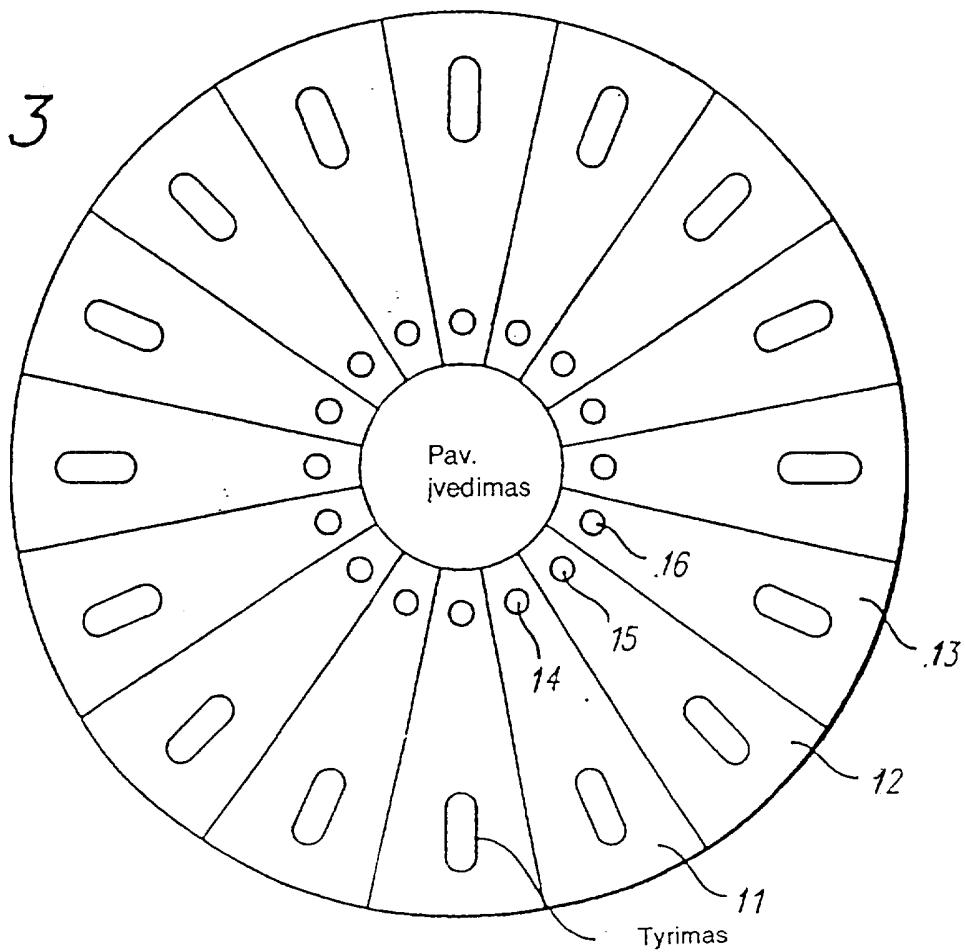


FIG. 4

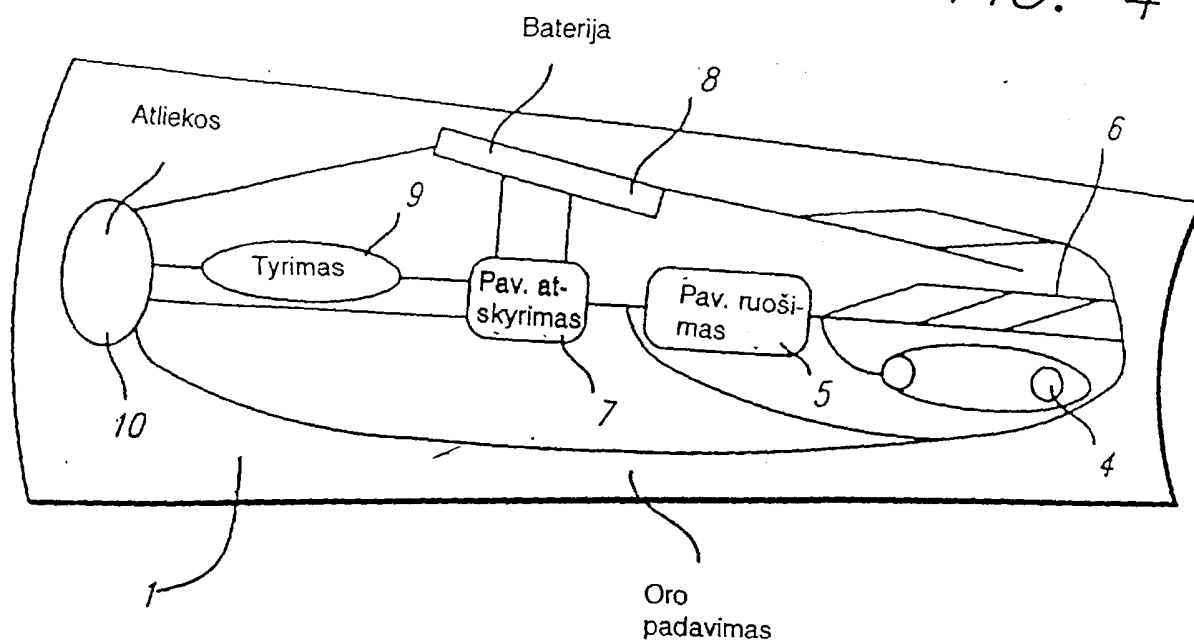


FIG. 5

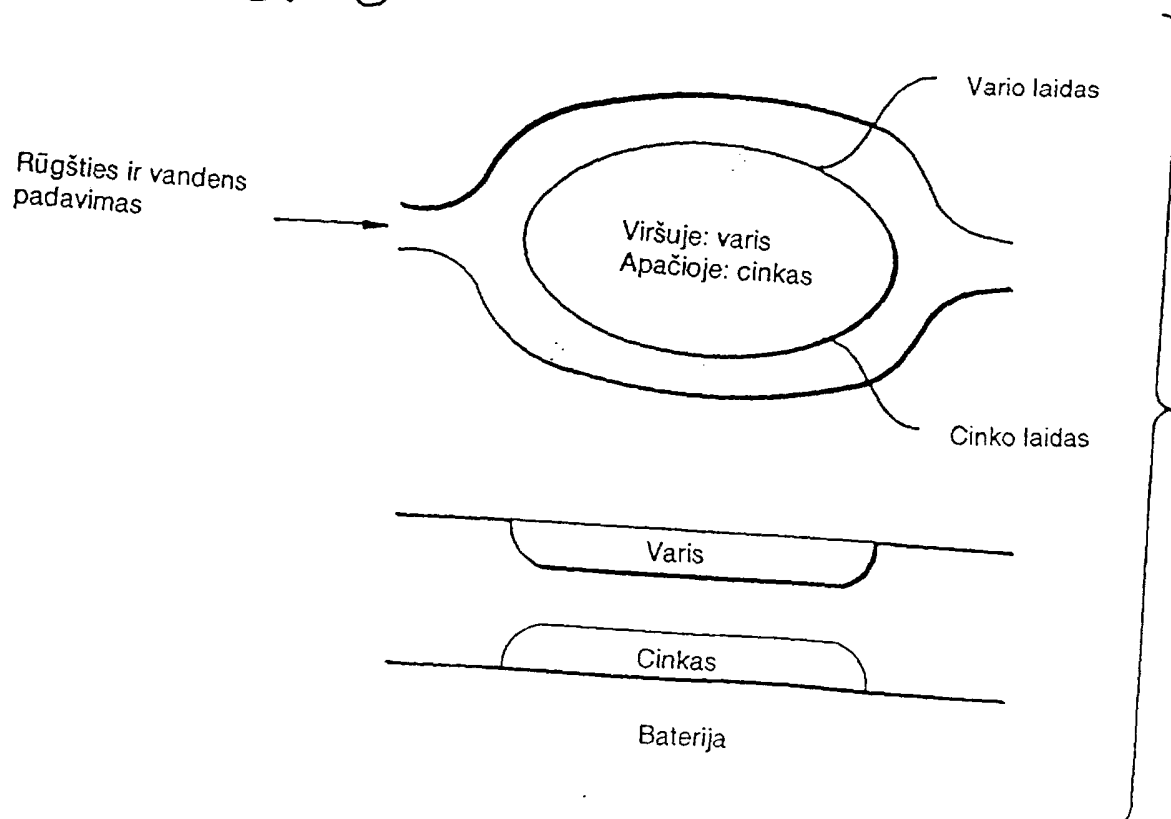


FIG. 6

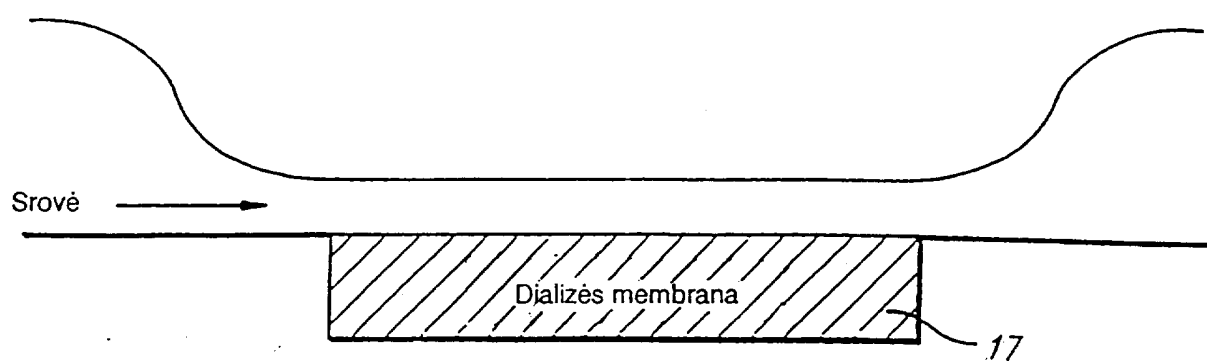


FIG. 7

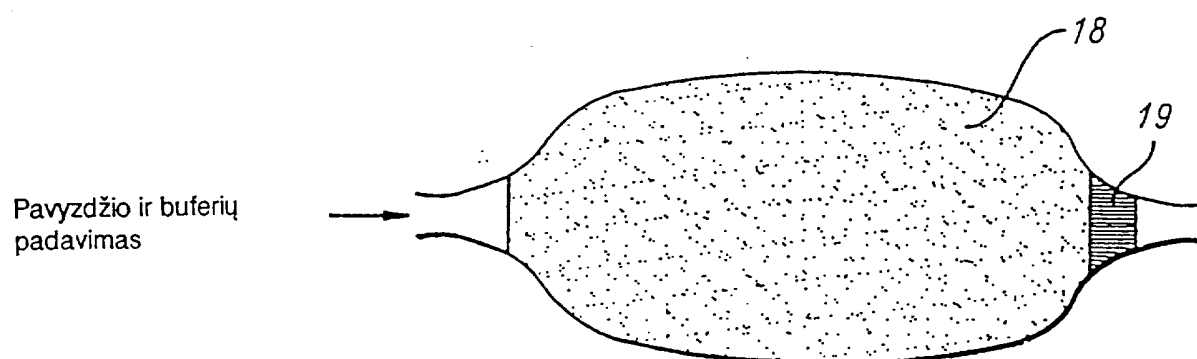
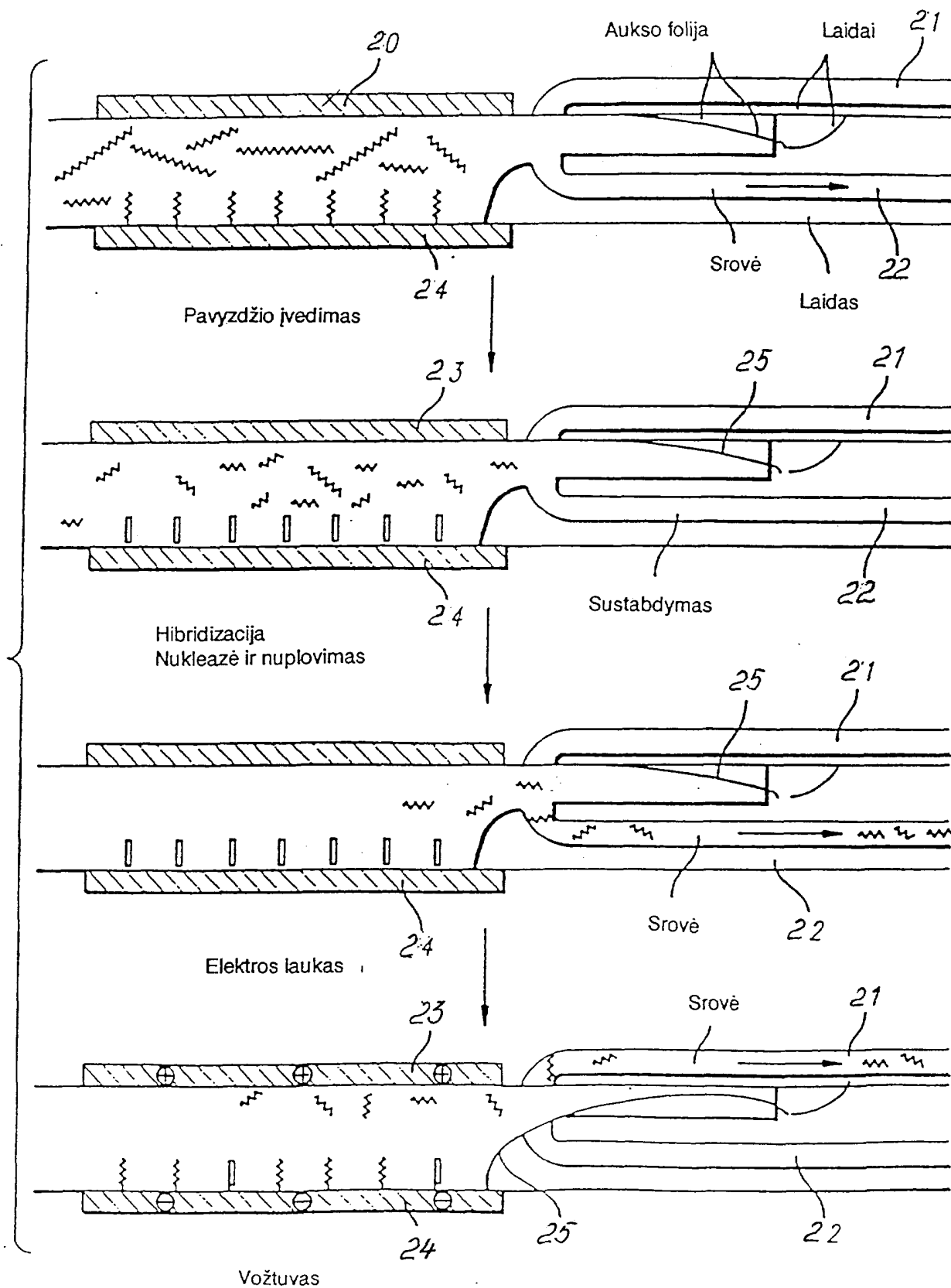


FIG. 8



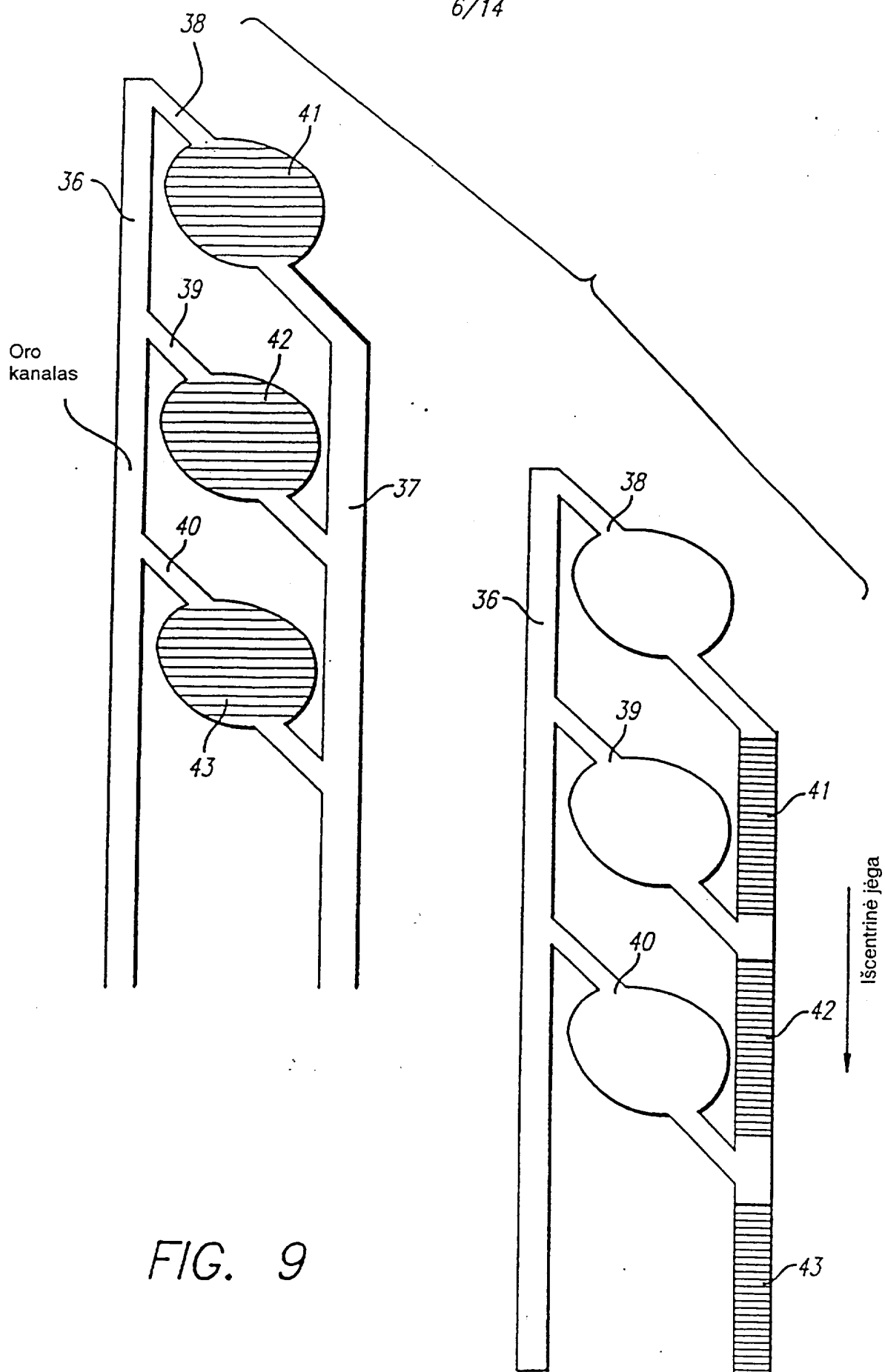


FIG. 9

Pavyzdžio įvedimas

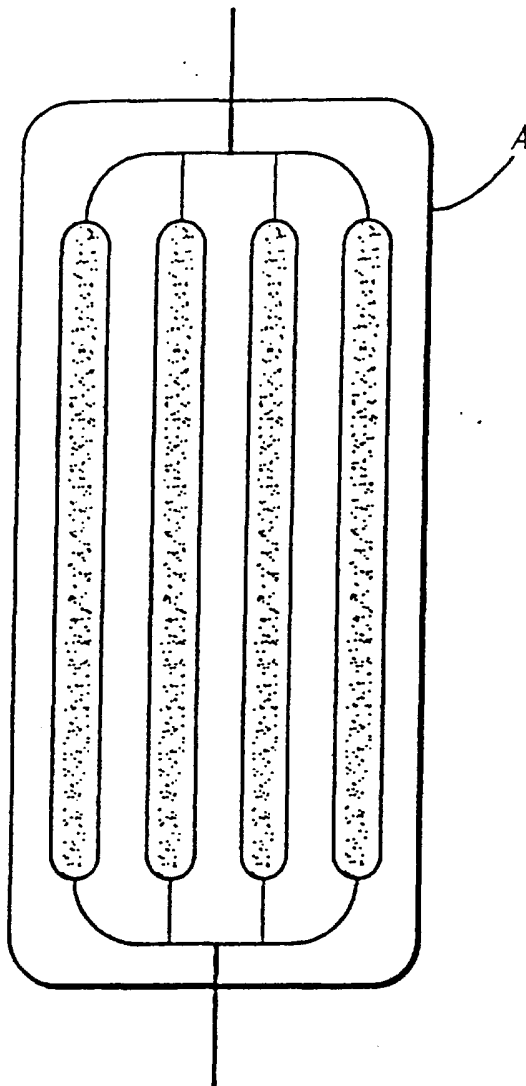


FIG. 10

Pavyzdžio pašalinimas

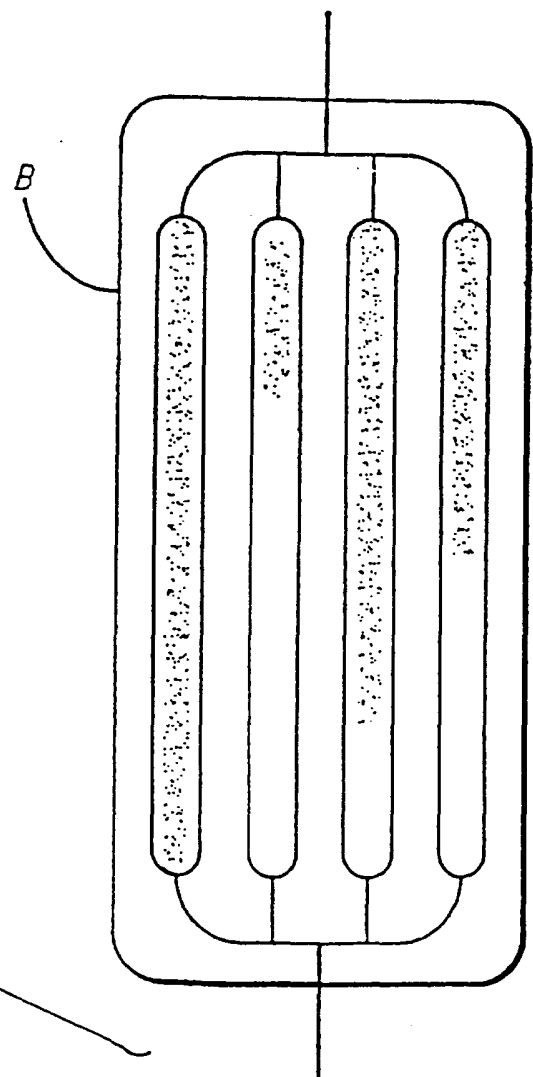


FIG. 11A

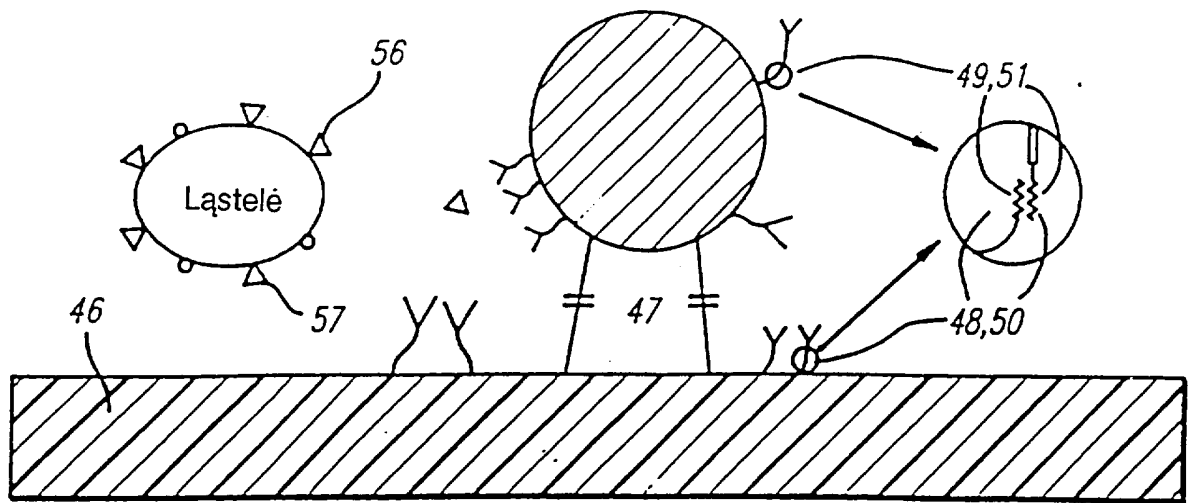


FIG. 11B

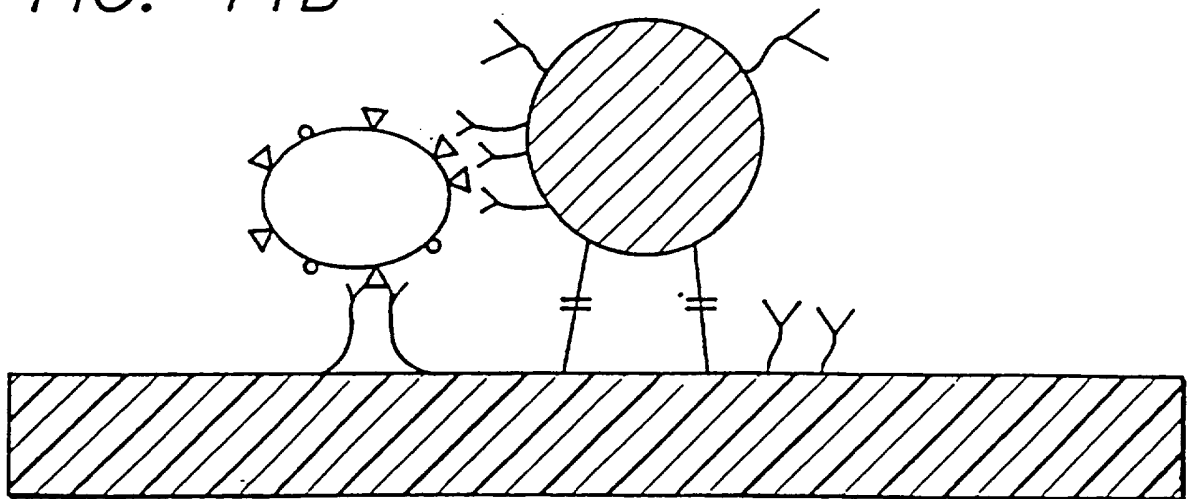


FIG. 11C

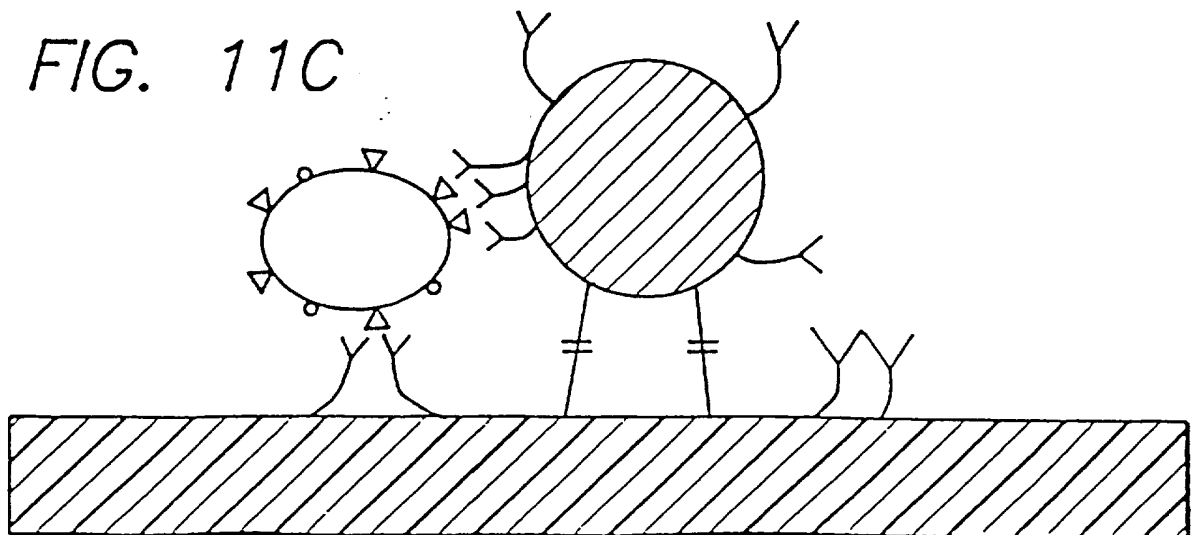


FIG. 12A

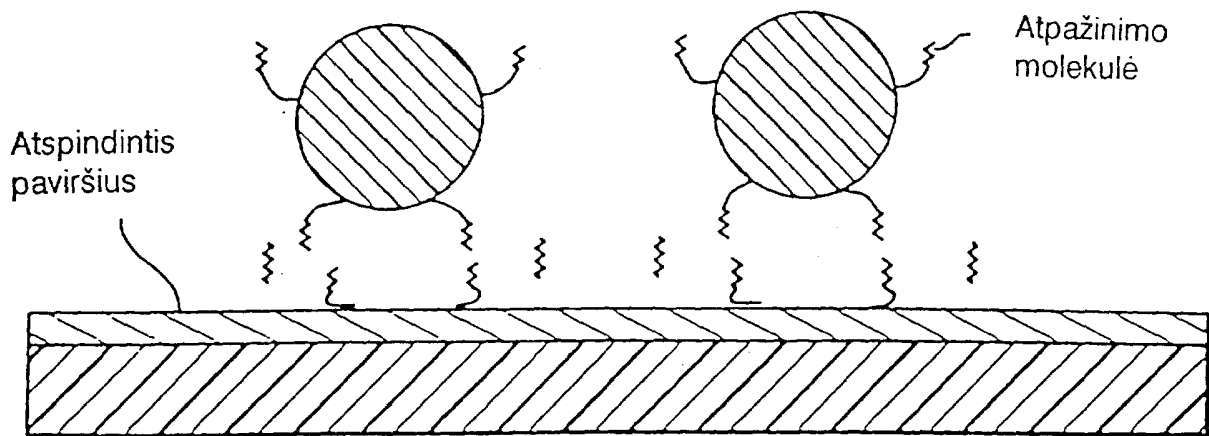


FIG. 12B

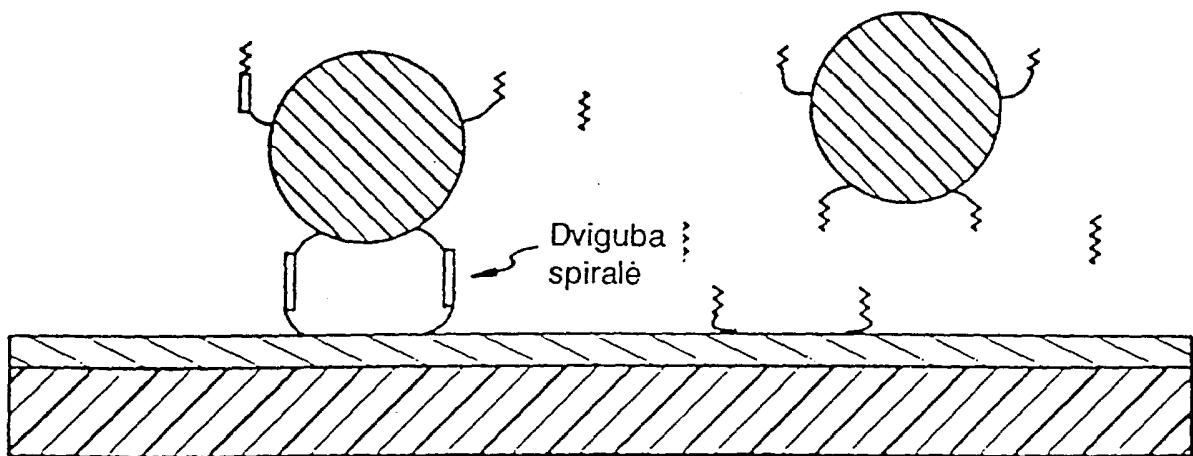


FIG. 12C

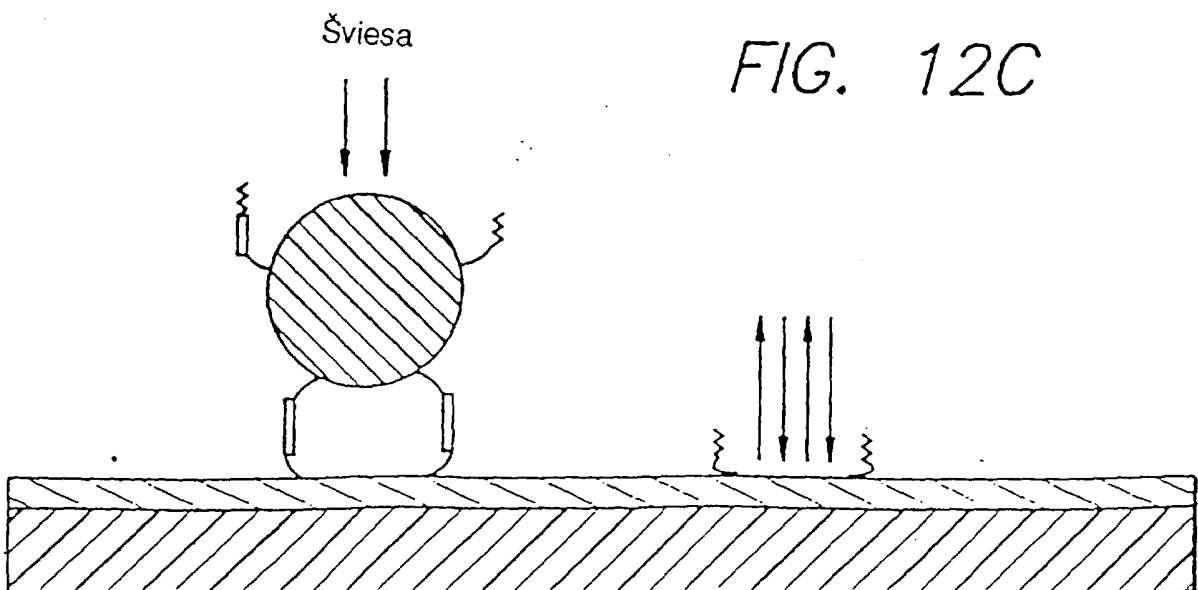
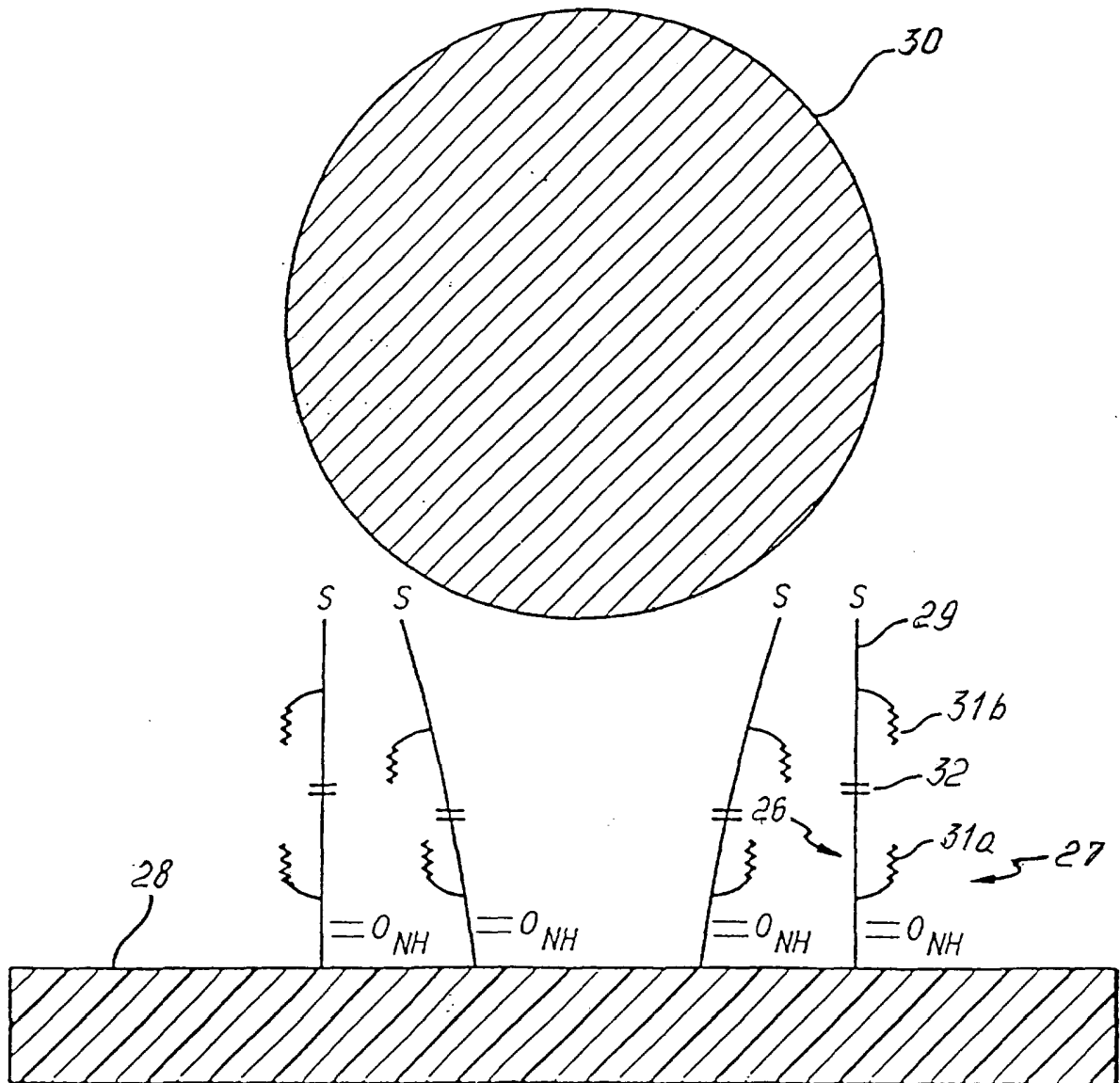


FIG. 13



11/14

FIG. 14a

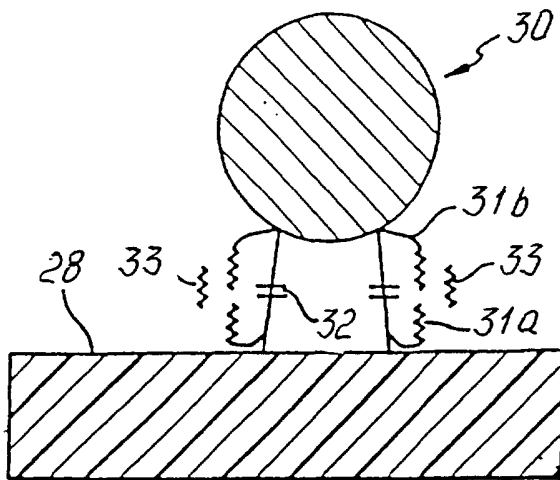


FIG. 14b

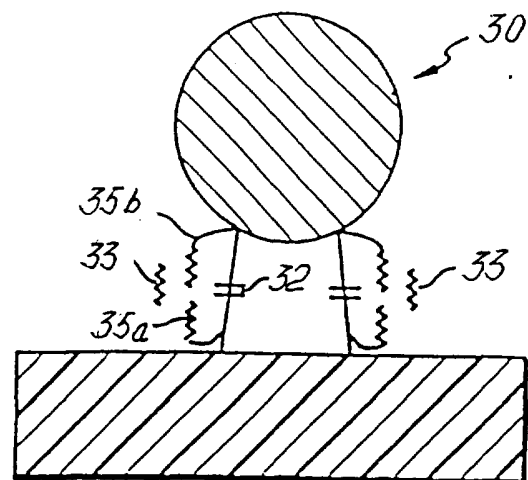


FIG. 14c

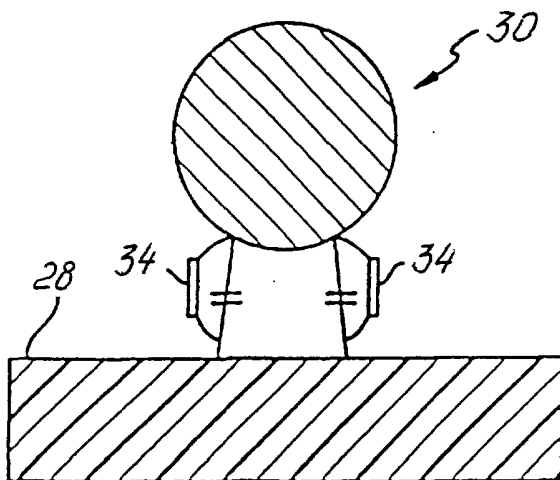


FIG. 14d

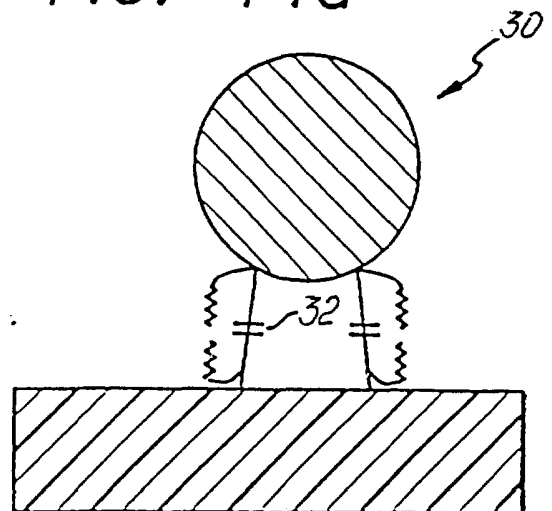


FIG. 14e

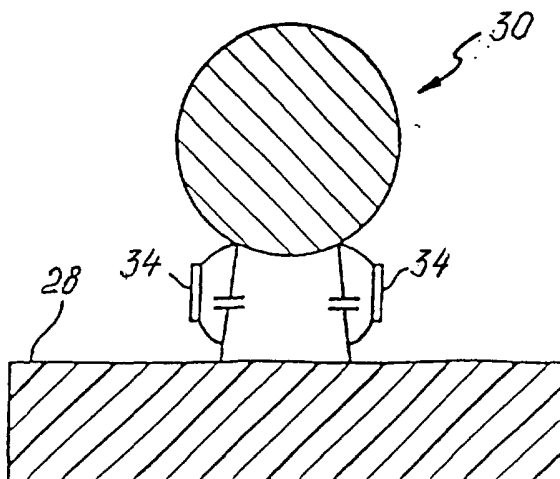


FIG. 14f

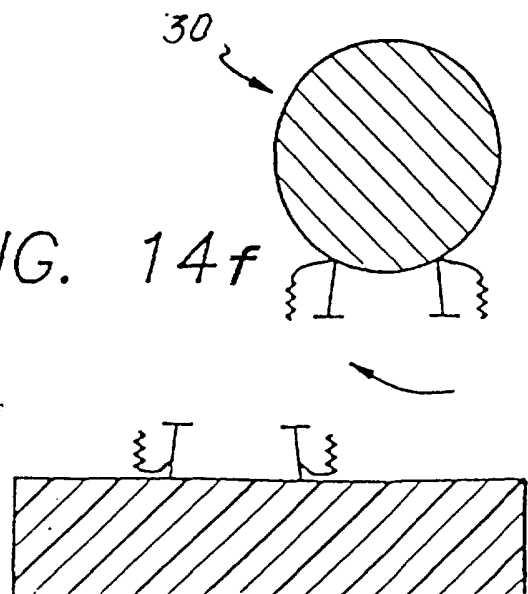


FIG. 15A

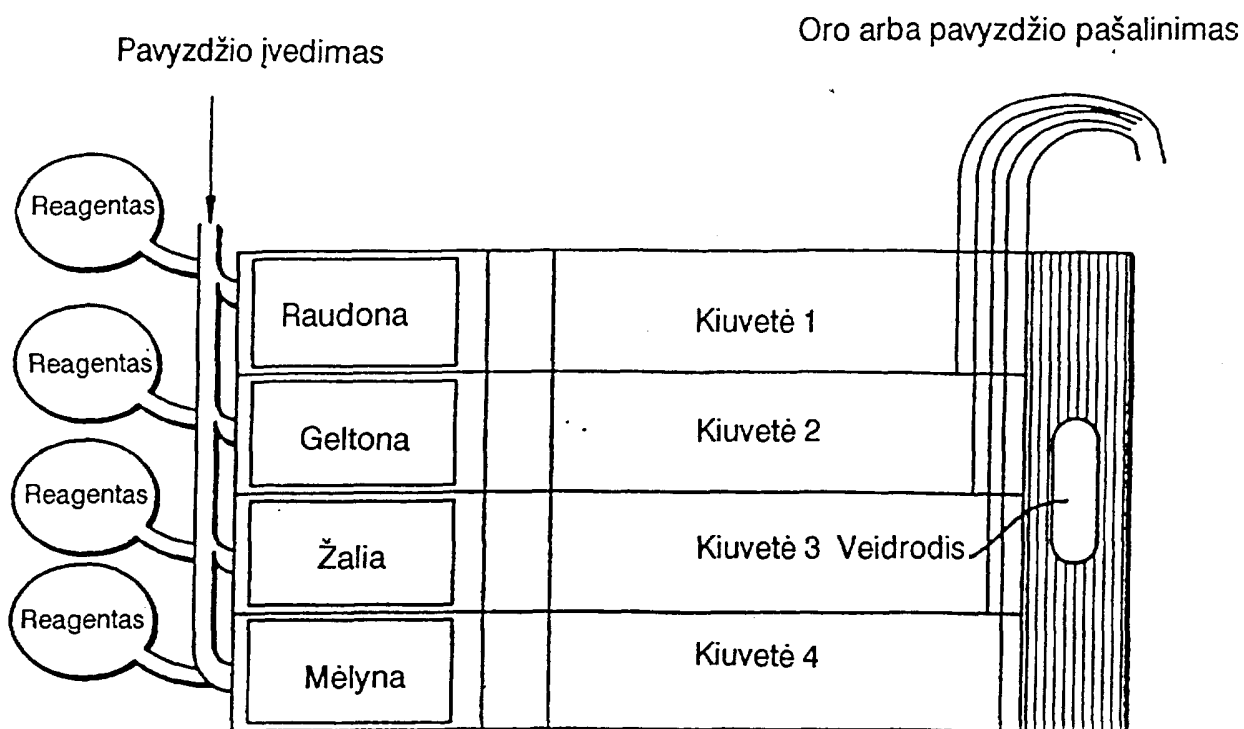


FIG. 15B

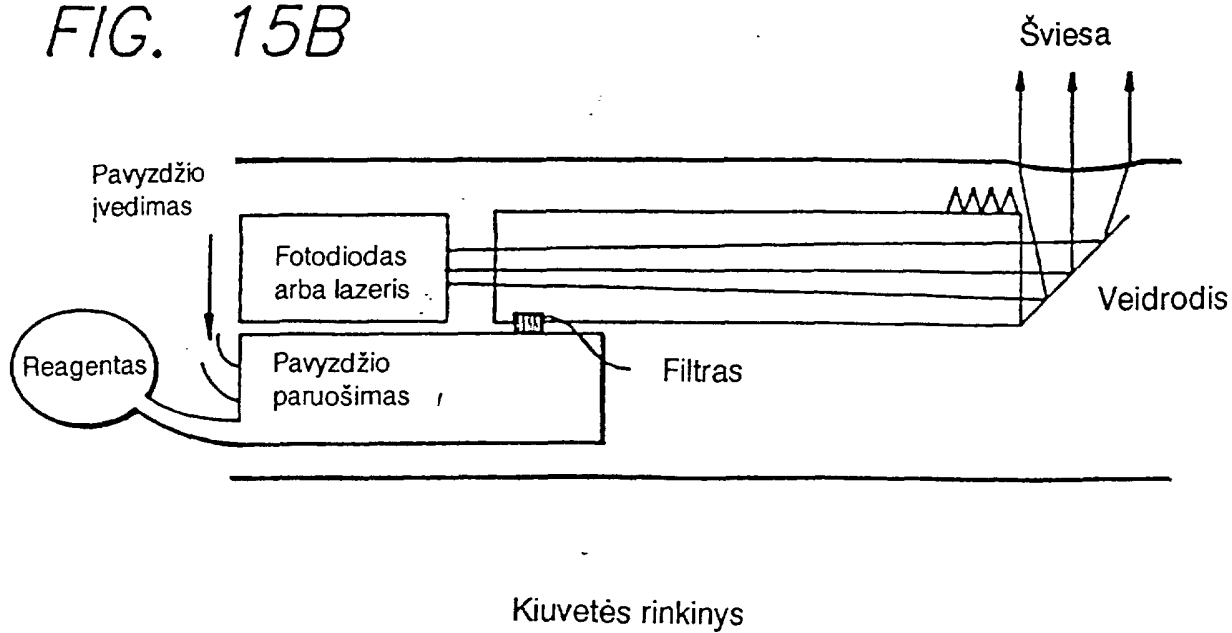


FIG. 16

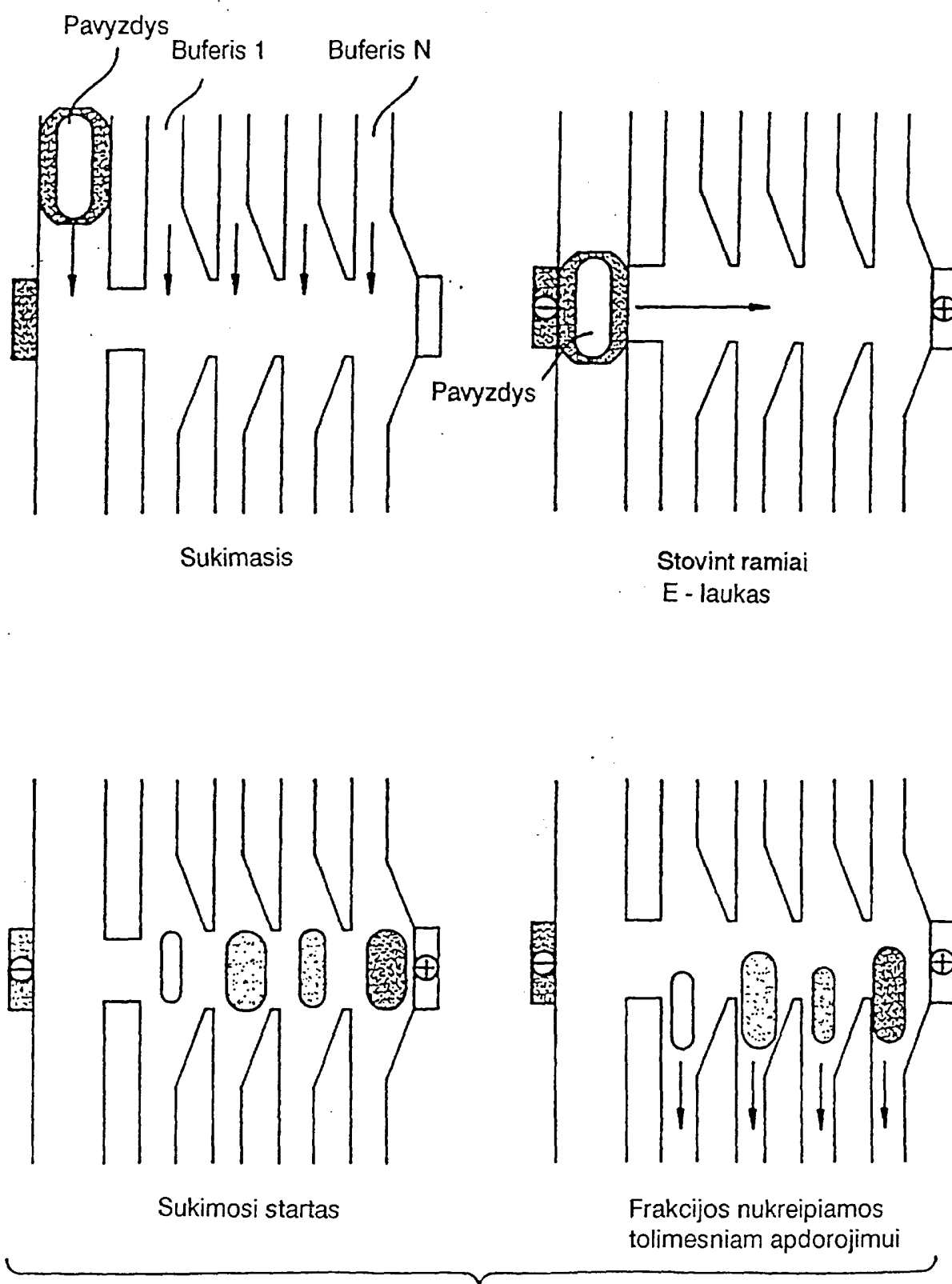


FIG. 17

