

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 934669 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE
PUBLIC**

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **934669**

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
C12Q 1/68
C12M 1/00

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **22.10.1993**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **22.10.1993**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **24.04.1994**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **13.06.2019**

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

23.10.1992 US 965683 20.11.1992 US 979569

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 •Clinical Diagnostic Systems Inc., 100 Indigo Creek Drive Rochester, N.Y. 14650, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 •Chemelli, John Benjamin, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

2 •Chen, Paul Hong-Dze, Room 202A, Boston, Mass. 02115-5750, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

3 •Findlay, John Bruce, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

4 •Atwood, Susan Melissa, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

5 •Bergmeyer, Lynn, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Nukleiinihappomateriaalin vahvistaminen ja toteaminen ilman pesua

Amplifikation av nukleinsyramaterial och detektering därav utan tvätt

Nukleiinihappomateriaalin vahvistaminen ja toteaminen ilman pesua

5 Tämä keksintö koskee reaktiopusseja tai -laitteita ja menetelmiä, joita käytetään nukleiinihappomateriaalien vahvistamiseksi ja toteamiseksi.

EP-patenttihakemusjulkaisussa 381 501 ^{Doyle 7/00} kuvataan DNA:n toteamista käyttäen menetelmää, jossa pienenpienien määrrien nukleiinihappomateriaalia PCR-vahvistaminen ja
10 vahvistetun materiaalin toteaminen voivat molemmat tapahtua yhdessä yksittäisessä pussissa, joka estää vahvistetun materiaalin karkaamisen. Käytetään kuutta tilapäisesti tiiviisti suljettua rakkulaa, joita kutsutaan myös osastoiksi, ja joita väylät yhdistävät toteamiskeskukseen
15 toteamisosastossa. Rakkulat käsittävät järjestyksessä PCR-reaktio-osaston; ensimmäisen pesuosaston; entsyymi-leimausosaston, joka sisältää esimerkiksi streptavidini-piparjuuriperoksidaasia (tästä eteenpäin SA-HRP); toisen pesuosaston; osaston, joka sisältää entsyymiin reagoivaa
20 signaalimateriaalia; ja pysäytysliuososaston. Kukin näistä saadaan tyhjentymään mainitussa järjestyksessä toteamis-osastoon, jossa käytetään toteamiskeskusta vahvistetun nukleiinihappomateriaalin sieppaamiseksi sekä todettavan signaalin muodostamiseksi.

25 Kahden pesuosaston käyttäminen kahden pesuvaiheen saamiseksi on yhtäpitävä kaikkiin tavanomaisiin lähestymistapoihin nukleiinihappomateriaalin toteamiseksi nähden. Esimerkiksi julkaisussa J. Clin. Microbiol. 30 (huhtikuu, 1992) 845 - 853 kuvataan Rochen käyttämää menetelmää (ss. 846 - 847) menetelmänä, jossa biotinyloidun tuotteen hybridisaation kiinteään seinäpintaan jälkeen "pesimme levyn 4 kertaan pesupuskurilla I mahdollisen hybridisoitumatta jääneen tuotteen poistamiseksi". Nämä neljä pesua vastaavat ensimmäisen pesurakkulan ensimmäistä pesuvaihetta
30
35 EP-patenttihakemusjulkaisun 381 501 mukaisessa pussissa,

koska siinä samoin mahdollinen DNA tai nukleiinihappomateriaali, joka on "epähybridisoitunut" toteamiskeskuksiin, pestään pois. Tämän jälkeen Roche-menettelyssä inkuboidaan "37 °C:ssa 15 minuutin ajan avidiini-piparjuuriperoksidääsikongugaatilla", mikä luonnollisesti vastaa EPA-pussin entsyymirakkulan tyhjentämistä aivan samassa tarkoituksessa. Sen jälkeen Roche-menettelyn mukaan "jälleen pestiin levy 4 kertaan" "sitoutumatta jääneen kongugaatin poistamiseksi". Tämä luonnollisesti vastaa toista pesuvaihetta, joka suoritetaan toisessa pesurakkulassa, joka sijaitsee entsyymirakkulan ja signaalimateriaalirakkulan välissä EPA-julkaisun 381 501 mukaisessa pussissa.

Tällaiset menettelyt kaikkine pesuineen vaikkakin ovat käyttökelpoisia ovat aikaaviepiä ja sen vuoksi kalliita. Edelleen pesut tuottavat komplikaatioita pussin valmistukseen. Kuitenkin niitä on pidetty oleellisina "eispesifisen signaalin" eliminoimiseksi, eli signaalin eliminoimiseksi, joka esiintyy, koska läsnä on joko sitoutumatonta nukleiinihappomateriaalia, joka EI ole kohde, ja/tai sitoutumatonta SA-HRP:tä, jota ei tulisi olla läsnä, koska kohdenukleiinihappomateriaalia ei ole läsnä.

Täten ennen tätä keksintöä ongelmana on ollut kehittää toteamissarja, joka eliminoi ainakin yhden pesuvaiheen, ja edullisesti molemmat pesuvaiheet, ja siihen tai niihin tarvittavat pesurakkulat aiheuttamatta niin paljon hälyä toteamisessa, että signaalista tulee epäluotettava.

Olemme todenneet, että pussiformaatista, jota käytetään EPA-julkaisussa 381 501 kuvatuissa menetelmissä, voidaan poistaa yksi pesurakkula tai molemmat pesurakkulat saaden samalla oleellisesti sama tulos. Tämä oli erityisen yllättävää otettaessa huomioon se huomattava historia, joka on sanellut, että pesut ovat oleellinen vaihe.

Spesifisemmin keksinnön yhden näkökohdan mukaan ongelma ratkaistaan menetelmällä vahvistetun nukleiini-

happomateriaalin toteamiseksi, jonka mukaan tällainen materiaali hybridisoidaan toteamiskeskukseen, joka käsittää ainakin yhden immobilisoidun koettimen, hybridisoitu ja sitten immobilisoitu nukleiinihappomateriaali leimataan 5 tuomalla keskukseen leima, joka on signaalimateriaali, tai on vuorovaikutuksessa signaalimateriaalin kanssa, signaalin tuottamiseksi, minkä jälkeen keskukseen lisätään signaalimateriaali todettavan signaalin tuottamiseksi; jolloin menetelmälle on tunnusomaista, että joko leimausvaihetta käytetään välittömästi hybridisaatiovaiheen jälkeen ilman, että väliin edellytetään pesuvaihetta, tai lisäysvaihetta käytetään välittömästi leimausvaiheen jälkeen ilman, että väliin edellytetään pesuvaihetta. Kuten tulee ilmeiseksi, "joko-tai" käytettynä tässä asiansyhteydessä on 10 ei-poisrajaava käyttö.

Keksinnön toisen näkökohdan mukaan ongelma ratkaistaan laitteella nukleiinihappomateriaalin vahvistamiseksi ja toteamiseksi käyttämällä ainakin yhtä kohdesäiettä templaattina, jolloin laite käsittää reaktio-osaston nukleiinihappomateriaalinäytteen vahvistamiseksi, toteamiskeskuk- 20 sen vahvistetun nukleiinihappomateriaalin toteamiseksi ja varasto-osastoja, jotka sisältävät signaalimateriaalia ja leiman, jotka kykenevät yhdessä muodostamaan todettavan signaalin, sekä väyliä osastojen yhdistämiseksi juoksevasti keskukseen; jolloin laitteelle on tunnusomaista, että se sisältää edelleen ei enempää kuin yhden pesuosaston, joka sisältää pesunestettä, joka oleellisesti ei sisällä reagensseja, joita käytetään varasto- tai reaktio-osastoissa, ja ei enempää kuin yhden väylän, joka yhdistää pesuosaston toteamiskeskukseen, jolloin korkeintaan yhtä pesuvaihetta käytetään vaihesarjassa, joka käsittää osastojen sisältöjen tyhjennyksen ja siirtämisen toteamiskeskukseen. 30

Täten keksinnön edullinen ja odottamaton piirre on, 35 että annetaan käyttöön menetelmä ja laite nukleiinihappo-

materiaalin vahvistamiseksi ja toteamiseksi, joilla välte-
tään ainakin yksi pesuista, joita tähän asti on pidetty
välttämättöminä halutun tuloksen saamiseksi.

5 Muita edullisia piirteitä tulee ilmeiseksi tutus-
tuttaessa seuraavaan yksityiskohtaiseen kuvaukseen oheis-
ten piirrosten valossa, joissa:

Kuvio 1 on tasokuva keksinnön mukaan rakennetusta
reaktiolaitteesta; ja

10 kuviot 2 ja 3 ovat samankaltaisia tasokuvia kuin
kuviossa 1 esitetty, mutta ne esittävät keksinnön vaihto-
ehtoisia muotoja;

kuviot 4A - 4C ovat osaleikkauskuvia, jotka esit-
televät keksinnön oletettua mekanismia;

15 kuviot 5A - 5B ja 6A - 6B ovat pylväsdiagrammeja,
jotka esittävät toistuvia väripisteitä, joihin päästään
käyttämällä keksintöä (5A, 6A ja 6B) tai vertailuesimerk-
kiä (5B); ja

20 kuvio 7 on kuvion 2 kaltainen tasokuva, joka esit-
tää kuitenkin työesimerkeissä käytettyä modifioitua pus-
sia.

25 Kuvauksessa tästä eteenpäin esitetään keksintö sen
edullisten suoritusmuotojen yhteydessä, joissa annetaan
käyttöön taipuisa pussi tai laite, jota käytetään tavalla,
jota kuvataan yhteisesti omistetussa US-patentissa nro 5
229 297. (Osa tuosta julkistuksesta on sama kuin julkis-
tus, joka esiintyy EPA-julkaisussa 381 501.) Lisäksi kek-
sintö on käyttökelpoinen riippumatta siitä, käytetäänkö
PCR-vahvistusta vai ei, ja riippumatta tuon pussin kaikki-
en piirteiden läsnäolosta edellyttäen, että mukaan on si-
sällytetty korkeintaan yksi pesuosasto, mistä tuloksena on
30 korkeintaan yksi välipesuvaihe.

Tässä käytettynä "pesu" tai "pesuliuos" tarkoittaa
liuosta, joka oleellisesti ei sisällä sieppaus-, leima- ja
signaalinmuodostusreagensseja, joita käytetään muissa

osastoissa, eli joko leimaosastossa tai signaalimateriaaliosastossa.

Edellä mainitun US-julkaisun sarjanro 673 053 mukaisen taipuisan pussin kykyä tuottaa pesuvaiheen eliminaatio ilman, että haittaavasti saadaan ei-spesifinen signaali, ei täysin ymmärretä. Arvellaan kuitenkin, se on seurausta pussin rakentamisesta tavalla, joka aikaansaa kunkin perättäisen nestetulpan lineaarisen kulun, jolloin "tulpan" eturintama vaikuttaa pesemällä pois edeltävän "tulpan" jättämät sitoutumatta jääneet reagenssit. Mahdollisella vuorovaikutuksella, joka tapahtuu tällaisessa "eturintamassa", on vähäisiä tai ei mitään vaikutuksia immobilisoiduissa keskuksissa kehitettyyn signaaliin. Edelleen kukin nestetulppa kokonaisuudessaan kulkee yli toteamiskeskuksen (-keskusten), mikä parantaa tehokkuutta. Mahdollinen leikkausta ohentava geeli, jota voidaan lisätä kuten jäljempänä kuvataan, tehostaa tätä kykyä sikäli, että se vaikuttaa luovan raskasliikkeisemmän tulpan, joka hidastaa tulpan eturajan poistamien ainesosien kulkeutumista takaisinpäin.

Kuvio 1 havainnollistaa tämän keksinnön yhtä muotoa, jossa pesuosasto ja pesuvaihe reaktio-osaston ja leimaosaston välistä on eliminoitu. Reaktiokyvetti tai -laite 10 käsittää potilasnäytenesteen ruiskuttamista varten tuloaukon 22, jonka väylä 21 yhdistää PCR-reaktio-osastoon 26. Sulku 46 salpaa tilapäisesti virtauksen pois osastosta 26. Kun sulku 46 rikotaan, neste tulee syötteeksi väylän 44 kautta toteamiskammioon 40, jossa on keskuksia 41, jotka käsittävät edullisesti helmiä, jotka on ankkuroitu paikoilleen ja jotka muodostavat kompleksin mahdollisen kohdeanalyytin kanssa, joka ohittaa ne tullessaan osastosta 26, ja sitten reagenssien kanssa, jotka tulevat muista reagenssiosastoista. Nuo muut osastot ovat osastot 30, 32, 34, joista kustakin syöttö tapahtuu väyliä 48 ja 50 pitkin kammioon 40. Kukin noista väylistä on ti-

lapäisesti salvattu kohdassa 56, ja sisältää tarkoituksenmukaista reagenssinestettä.

Yksityiskohdat kemikaaleista, jotka ovat käyttökelpoisia kaikissa osastoissa, ja keskuksissa 41, selitetään yksityiskohtaisemmin edellä mainitussa US-julkaisussa sarjanro 673 053. Pesuosasto käsittää edullisesti puskurin, pinta-aktiivisia aineita, EDTA:ta, NaCl:ää ja muita suoloja.

Tämän keksinnön mukaan välttämättömien osastojen lukumäärää on yksinkertaistettu. Täten:

Osasto 26, käyttäjän lisäämän potilasnäytteen lisäksi, sisältää edullisesti kaikki tavanomaiset, PCR-vahvistuksessa tarvittavat reagenssit, jotka mahdollisesti pidetään paikoillaan tilapäisellä sululla 25. (Reagenssit voidaan esisisällyttää tai lisätä potilasnäytteen kanssa tämä lisättäessä.) Reagenssit käsittävät alukkeet, jotka on sidottu sitoutumisparin yhteen jäseneen, jolloin parin toinen jäsen on alla kuvatussa osastossa 30. Käyttökelpoinen esimerkki alukkeeseen kiinnitetystä sitoutumisparista on biotiini. (Jos se on läsnä, sulku 25 puhkaistaan ruiskuttamalla näyte.)

Osasto 30 käsittää edullisesti leiman kuten entsyymin, joka on sidottu kompleksoivaan aineeseen kuten avidiiniin, joka on sitoutumisparin jäsen, jolloin tuon parin toinen jäsen on sidottu alukkeeseen, josta tulee osa kohdeanalyyttiä vahvistuksen aikana reaktio-osastossa 26 edellä kuvatun mukaisesti. Täten käyttökelpoinen reagenssi osastossa 30 on streptavidinipiparjuuriperoksidaasi (tässä eteenpäin SA-HRP). Tuon sitoutumisparin toinen jäsen on silloin biotiini.

Muutkin leimat kuin entsyymit ovat käyttökelpoisia. Esimerkiksi fluoresoivia, radioaktiivisia ja kemiluminoivia leimoja tunnetaan samoin hyvin tällaisiin käyttöihin. Kemiluminoivat leimat samoin edullisesti käyttävät osastoa

34, joka sisältää signaalireagenssin, mitä käsitellään alla entsyymileimoille.

Osasto 32 käsittää edullisesti pesuliuoksen reagenssina.

5 Osasto 34 käsittää edullisesti signaalimateriaalin, ja jonkin väriä stabiloivan aineen, joka saattaa olla käyttökelpoinen. Täten esimerkiksi käyttökelpoinen reagenssiliuos osastossa 34 on liuos leukoväristä, joka on tavanomainen substraatti osaston 30 entsyymille. H_2O_2 :ta ja
10 jotain leikkausta ohentavia geelejä sisällytetään samoin mukaan.

Osasto 42 on jätekeräysosasto, joka mahdollisesti sisältää absorbanttia.

15 Tela 60 on esimerkki ulkoisesta painelaitteesta, jota käytetään kunkin osastoista purkamiseksi peräkkäin, vastaavan osaston sisällön työntämiseksi sarjassa toteamiskammioon 40. Koska kaikki osastot ja väylät pysyvät salvattuina prosessoinnin aikana, vuotoa ulos laitteesta ei tapahdu ja siirtymiskontaminaatio estetään. Aukon 22
20 salpaamiseen päästään taittamalla kulma 70 taittolinjaa 72 pitkin siten, että kolo 74 sopii aukon 22 päälle ja väylä 21 tulee tukituksi. Sulkulaippaa käytetään sitten kulman 70 pitämiseksi näin taitettuna.

6
25 Käyttökelpoinen prosessori laitteen 10 käyttämiseksi esitetään EPA-julkaisussa 402 994. Tällaisessa prosessorissa on tukipinta, jolle on sijoitettu ryhmä laitteita 10, ja paine-elimia, esimerkiksi teloja, on asennettu paikoilleen kunkin kyveteistä prosessoimiseksi rinnan. Teloja on laakeroitu useampia yhteen tai useampaan akseliin kätevyyden vuoksi, jolloin näitä akseleita pyörittää differentiaalisesti vaihteisto. Edullisesti tukipinta on vaakatasossa tai kallistettu aina 15° vaakatasosta. Lisäksi kuumentimia voidaan mahdollisesti sisällyttää mukaan, joko
30 paikoilleen kiinnitetyssä muodossa tai telojen mukana kannettavina.
35

Täten käytetään yhtä ja vain yhtä pesuosastoa 32, jolla saadaan pesuvaihe SA-HRP:m inkuboinnin osaston 40 keskuksissa 41 jälkeen mahdollisen sitoutumatta jääneen SA-HRP:n poistamiseksi. Arvellaan, ettei pesuvaihetta tai pesunestettä tarvitse sisällyttää vahvistetun nukleiinihappomateriaalin ja SA-HRP:n vastaavien perättäisten siirtymisten keskuksiin 41 väliin siksi, että kukin toteamiskeskukseen matkalla oleva reagenssi tulee tehokkaasti pestyksi pois asemaan saapuvan seuraavan reagenssin toimesta. Yllättävää on, että kyseessä oleva pieni tilavuus kussakin osastossa suorittaa tämän riittävän hyvin.

Vaihtoehtoisesti (ei esitetä) käyttökelpoinen on aivan sama rakenne kuin kuviossa 1, jossa kuitenkin pesuneste sijaitsee vain osastossa 30, jolloin SA-HRP sijaitsee tässä tapauksessa osastossa 32. Tässä suoritusmuodossa menetelmän mukaan osaston 34 signaalimateriaali saatetaan suoraan vuorovaikutukseen keskusten 41 kanssa välittömästi SA-HRP:n inkuboinnin noissa keskuksissa jälkeen ilman mittään välipesua. Syyt, miksi näin voidaan menetellä, ovat samat kuin esitettiin edeltävälle suoritusmuodolle.

Kummassakin suoritusmuodossa pesuosastoa voidaan haluttaessa täydentää ylimääräisellä pesunesteellä. Kätevä tapa tämän suorittamiseksi, kuviossa 2, on lisätä pesuosasto ensimmäisen pesuosaston viereen, jolloin aluksi ensimmäinen pesuosasto tyhjennetään toteamiskeskukseen ja sitten toinen pesuosasto. Osista, jotka ovat samanlaisia kuin aiemmin kuvatut, käytetään samaa viitenumeroa, johon on liitetty erottava liite "A".

Täten pussi 10A käsittää tarkalleen samat piirteet kuin kuvion 1 mukaisessa suoritusmuodossa lukuun ottamatta, että osastojen 32A ja 34A väliin on sijoitettu ylimääräinen, tilapäisesti salvattu osasto 36 pesunestettä. Väylä 52 yhdistää sen osastoon 40A sen jälkeen, kun osaston 36 sulku 56A on puhkaistu.

Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää yksittäistä pesuosastoa, jossa on kuitenkin suurempi tilavuus pesunestettä.

5 Välttämättä ei ole lainkaan pesuosastoa tai lainkaan pesuvaihetta, jolloin päästään kuviossa 3 esitettyyn tilanteeseen. Osista, jotka ovat samanlaisia kuin aiemmin kuvatut, käytetään samaa viitenumeroa, johon on liitetty erottava liite "B".

10 Täten kuviossa 3 pussi 10B käsittää kaikki aiemmin kuvattujen suoritusmuotojen piirteet lukuun ottamatta, ettei pesuosastoa ole lainkaan. Ainoat osastot ovat lämpökierrätysreaktio-osasto 26B, leiman sisältävä osasto 30B (jossa on esimerkiksi streptavidiinipiparjuuriperoksidasia) ja osasto 34B, joka sisältää signaalimateriaalin, 15 esimerkiksi H_2O_2 :ta, mahdollisesti leikkausta ohentavaa geeliä, jota kuvataan välittömästi tämän jälkeen, ja leukoväriä, joka reagoi leimaentsyymin kanssa tuottaen värin. Kun tela 60B puhkaisee peräkkäin sulut 46B ja 56B, sisälöt tyhjenevät väyliä 44B ja vastaavasti 48B pitkin toteamiskeskukseen 40B ja sitten jäteosastoon 42B. 20

Kaikissa suoritusmuodoissa mahdollinen ainesosa sisällytettäväksi mukaan signaalimateriaalin kanssa on noin 0,5-%:inen agarosiliuos värimuodostuksen stabiloimiseksi toteamisosaston toteamiskeskuksissa. Agarosii 25 käyttäytyy leikkausta ohentavasti sikäli, että sen viskositeetti noin tässä pitoisuudessa putoaa 27 poisea leikkauksenopeusvälillä $1 - 10^2 \text{ sek}^{-1}$ (yli 60 % sen laskusta), ja vain edelleen 3 poisea nopeuksille yli 10^2 mitattuna 40°C :ssa. Muitakin leikkausta ohentavia geelejä, joiden viskositeettikäyttäytyminen on samanlainen ja prosentuaalinen pitoisuus alhainen, voidaan käyttää. 30

Kuten edellä mainittiin, ei täysin ymmärretä, miten pussi yllättäen sallii pesuvaiheiden jättämisen pois, kun tähän asti niitä pidettiin oleellisina joko vahvistetun 35 materiaalin tai leiman ja seuraavan reagenssin lisäämisen

toteamiskeskukseen välillä. Kuviot 4A - 4C on sisällytetty mukaan oletetun mekanismin havainnollistuksen helpottamiseksi käyttäen esimerkiksi kuvion 3 mukaista suoritusmuotoa. Kuitenkin saman periaatteen arvellaan toimivan kaikissa suoritusmuodoissa.

Esitetään suurennettu toteamiskeskus 41B, joka käsittää immobilisoituja helmiä kuten kuvataan edellä mainitussa EPA-julkaisussa 381 051. Kuviossa 4A esitetyssä vaiheessa vahvistettu kohdenukleiinihappomateriaali, jossa on biotiinihantä, on merkitty aaltoviiva-B:llä. Tällainen materiaali on jo hybridisoitunut helmiin. Lisäksi leiman SA-HRP sisältävä osasto on tyhjennetty tuohon keskukseen. (SA-HRP on esitetty "A*" leimattuna avidiinina.) Jonkin verran tuosta SA-HRP:stä on jo sitoutunut kohteen biotiiniin, mutta osa on esitetty sitoutumattomana tai "irtonaisena" helmillä ja osaston 40B pinnalla.

Kun seuraava osasto, joka sisältää signaalimateriaalia kuten leukoväriä (merkitty "L.D."), puhkaistaan, leukoväri etenee "tulppana" 100, kuvio 4B. Sen johtava meniski 102 lähestyy keskusta 41B liikkeensä, nuoli 104, ansiosta. "Tulpan" 100 kulkiessa keskuksen 41B yli, kuvio 4C, se pyyhkäisee pois sitoutumatta jääneen edellisen reagenssin (A*) meniskissä 102 jättäen vain sitoutuneen leiman reagoimaan tulpan 100 loppuosan kanssa, jolloin keskuksessa 41B muodostuu väri. Koska (vain) alue 110 luetaan tai detektoidaan, mahdollinen ylimääräinen väri, joka muodostuu alavirtaan (meniskissä 102) on epäoleellinen. Tällaisen ylimääräisen värin kulkeutumista takaisin päin toteamiskeskukseen hidastetaan edelleen käyttämällä mahdollista, edellä kuvattua leikkausohennusgeeliä.

Seuraavat ei-kattavat esimerkit helpottavat keksinnön havainnollistamista.

Kaikissa esimerkeissä ja vertailuesimerkeissä käytettiin seuraavasti valmistettuja reagensseja, ellei toisin ole mainittu:

A. HUT/HIV-analyysin valmistus arvioitavaksi:

HUT/AAV/78-soluja, jotka sisälsivät yhden HIV-kopion solua kohden, käsiteltiin tavanomaisella fenolikloroformiuuttomenetelmällä DNA:n eristämiseksi, ja saatu DNA-määrä kvantitoitiin spektrofotometrillä. Talteen otettua DNA:ta (100 000 HIV-kopiota) vahvistettiin polymeraasiketjureaktiolla (PCR) koktailissa, joka sisälsi kutakin alla identifioitua aluketta (1 μ M kutakin), puskuria [10 mM magnesiumkloridi, 50 mM tris(hydroksimetyyli)aminometaani (TRIS), 50 mM kaliumkloridi ja 0,1 mg/ml gelatiinia], 1,5 mM kutakin dATP-, dCTP-, dGTP- ja dTTP-deoksinukleotiditrifosfaattia ja 40 yksikköä DNA-polymeraasia, joka oli saatu Thermus aquaticuksesta.

Käytettiin kahta alukesarjaa, jolloin yksi sarja oli komplementaarinen ENV-alueeseen nähden ja yksi sarja oli komplementaarinen GAG-alueeseen nähden HUT/HIV-DNA:ssa, kuten tiedetään käytettävän multipleksoinnissa. Yksi aluke kummassakin sarjassa biotinyloitiin toteamisen helpottamiseksi. Kaksi tetraetyleeniglykolivälikeryhmää kiinnitettiin oligonukleotidiin US-patenttijulkaisussa 4 914 210 opetusten mukaan.

PCR-menettely suoritettiin käyttäen 250 μ l edeltävää koktailia PCR-reaktorakkuloissa PCR-analyysielementeissä, jotka olivat tyyppiä, jota kuvataan julkaisuissa P.N. Schnipelsky et al., EPA 381 051 ja US-julkaisussa sarjanro 673 053, joka jätettiin 21. maaliskuuta 1991 (ei sallittu). Spesifisemmin käytettiin kuvion 7 mukaista pussia 10C. Osista, jotka ovat samanlaisia kuin aiemmin kuvatut, käytetään samaa viitenumeroa, johon on lisätty kirjain "C". Täten osastoja 26C, 30C, 32C, 36C ja 34C; väyliä 44C, 48C, 50C ja 52C; toteamiskeskusta 40C ja jäteosastoa 42C käytettiin kuten kuvattiin edellä lukuun ottamatta layoutia, tai kuten mainitaan jäljempänä. Ensinnäkin PCR-vahvistus suoritettiin testipussista 10C erillisessä pussissa, jolloin vahvistettu materiaali yh-

distettiin pooliksi ja ruiskutettiin sitten osastoon 26C tulosten yhtenäisyyden vuoksi kaikissa toistoissa, esimerkiksi 32 esimerkissä 1.

5 Käytettiin lämpökierrätysprosessoria, joka oli tyyppiä, jota kuvataan EP-patenttihakemusjulkaisussa 402 994.

10 Kohde-DNA esikuumennettiin 90 °C:seen 10 sekunniksi ja sitä denaturoitiin sitten 96 °C:ssa 30 sekunnin ajan, minkä jälkeen se jäähdytettiin 70 °C:seen 60 sekunniksi alukkeiden juottamiseksi ja alukelaajennustuotteiden tuottamiseksi. Viimeistä kahta vaihetta (kuumennus 96 °C:ssa, sitten 70 °C:ssa) toistettiin kaikkiaan 40 kierroksen ajan. Tämä PCR-menetelmä toistettiin 64 kertaan ja vastavalmistetun PCR-tuotteen sisältävä neste siirrettiin 64 PCR-rak-

15 kulasta yhteiseen astiaan PCR-tuotepoolin luomiseksi. Näytteitä tästä poolista laimennettiin 1:20 edellä kuvattuun PCR-puskuriin käytettäväksi jäljempänä kuvatuissa testeissä.

B. Pesuliuoksen valmistus (sitä käytettäessä):

20 Pesuliuos valmistettiin sisältämään 1 %:n natrium-desyylisulfaattia fosfaattipuskuroidussa suolaliuoksessa, joka sisälsi pitoisuudet 10 mM natriumfosfaatti, 150 mM natriumkloridi ja 1 mM etyleenidiamiinitetraetikkahappo, pH 7,4.

25 C. Streptavidini/piparjuuriperoksidaasi- (SA-HRP-) konjugaattiliuoksen valmistus:

Valmistajalta Zymed Labs (San Fransisko, CA) saatua streptavidinin ja piparjuuriperoksidaasin konjugaattia laimennettiin suhteessa 1:8 000 kaseiinia (0,5 %) sisältävällä fosfaattipuskuriliuoksella (pH 7,3), joka sisälsi timerosaalisäilytysainetta (0,01 %).

30

D. Leukovärikoostumuksen valmistus:

35 Liuos, jossa oli 25 g polyvinyylipyrrolidonia 100 ml:ssa vettä, sekoitettiin liuokseen, jossa oli 0,20 g 4,5-bis(4-dimetyyliaminofenyyli)-2-(4-hydroksi-3,5-dime-

toksifenyyli)imidatsolileukoväriä, joka muodostaa sinisen värin, 1 ml:ssa N,N-dimetyyliformamidia, ja sekoitettiin 1 tunnin ajan. Tämä lisättiin sitten liuokseen, joka oli valmistettu sekoittamalla 2,76 g mononatriumfosfaattimonohydraattia liuotettuna 1 900 ml:aan vettä, 0,2 ml dietyleenitriamiinipentaetikkahappoliuosta (0,1 M) ja 1,51 g 4'-hydroksiasetanilidia ja säätämällä pH 6,82:ksi lisäämällä 50-%:ista natriumhydroksidiliuosta. Sitten 2 ml 30-%:ista vetyperoksidiliuosta lisättiin ja seosta sekoitettiin väridispersioiden muodostamiseksi. Lopuksi 24,75 ml saatua väridispersiota sekoitettiin 0,25 ml:aan dimedonin 25 µM vesiliuosta ja 0,125 g:aan agaroosia värin muodostavan koostumuksen tuottamiseksi, joka sisältää 0,5 % agaroosia. Valmista koostumusta kuumennettiin ja sekoitettiin 80 °C:ssa, kunnes agaroosi liukeni, minkä jälkeen se jäähdytettiin huoneenlämpötilaan.

E. Koetinreagenssien valmistus:

Valmistettiin poly[styreeni-ko-3-(p-vinyylibentsyylitio)propionihappo]- (moolisuhde 97,6:2,4, painosuhde 95:5, 1 µm keskihalkaisija) polymeerihiukkasvesidispersio, ja jäljempänä kuvattu oligonukleotidi sidottiin kovalenttisesti polymeerihiukkasten yhteen osaan, ja toinen oligonukleotidi sidottiin kovalenttisesti polymeerihiukkasten toiseen osaan käyttäen US-julkaisussa sarjanro 654 112 (jätetty 2.12.91, Ponticello *et al.*) sekä EPA-julkaisussa 462 644, Sutton *et al.*, kuvattuja menettelyjä. Oligonukleotidit kytkettiin polymeerihiukkasiin kahden tetraetyleeniglykolivälikkeen, 3-amino-1,2-propaanidioliryhmän ja tyymiiniemäksen, välityksellä. Kukin oligonukleotidi kytkettiin polymeerihiukkasiin 3-amino-1,2-aminoryhmän välityksellä reagenssien muodostamiseksi US-julkaisun 4 962 029 mukaisilla menettelyillä.

Polymeeri/oligonukleotidihiukkaskoettimet sekoitettiin lateksiliimaan, joka koostui poly(metyyliakrylaatti-ko-natrium-2-akryyliamido-2-metyylipropaanisulfo-

naatti-ko-2-asetoasetoksietyylimetakrylaatista) (painosuhte 90:4:6), hiukkasten kuivapainosuhteen liimapolymeriin ollessa 4:0,1 (2,5 % liimaa). Vesidispersion kiintoaineepitoisuus oli 4 %.

5 Näitä reagenssikoostumuksia käytettiin sarjan analyttisiä laitteita valmistamiseksi, jotka sisälsivät reagenssit sieppauskoettimina HUT/HIV-määrittelyssä. Verrokkireagenssioligonukleotidisekvenssi on sekvenssi HIV-genomista ja sitä käytettiin ei-tietosekvenssinä. Tämän
10 ei-tietokoettimen ei tulisi siepata lainkaan HUT/HIV-analyttisekvenssejä, ja siten mitään värin kehittymistä ei tulisi tapahtua verrokkireagensseilla. Toinen koetinreagenssisekvenssi oli komplementaarinen sekvenssiin HUT/HIV-DNA:n ENV-alueella.

15 Edeltäviä reagensseja käytettiin sarjan analyysielementtejä (pusseja) valmistamiseksi, joissa kussakin oli reagenssiosastoja (joista yksi on PCR-reaktorirakkula, johon näyteanalyysi ensiksi vietään), toteutisosasto ja jätesäiliö. Analyysilaitteet (tai elementit) valmistettiin
20 kuumentamalla poly(etyleenitereftalaatti)/polyetyleenilaminaatti- (Scotchpak™ 241, 3M Co.) levyä muovausasemassa (tai muotissa), jolloin muodostettiin sarja painaumuksia (rakkuloita) levyn yhdelle puolelle ja suurempi painauma lähelle päätä, ja levyn toiselle puolelle, johon pääväylä lopulta johtaa, pääväylä ensimmäisestä rakkulasta viimeiseen ja sivuväyliä kustakin rakkulasta pääväylään, jolloin
25 laminoitaessa päälilevyyn myöhempänä ajankohtana saadussa pussissa oli kapeita väyliä, jotka johtivat painaumista pääväylään analogisesti laitteisiin nähden, joita kuvataan mainitussa US-julkaisussa sarjanro 673 053, Schnipelsky et al. Kukin painauma lukuun ottamatta niitä, joka sijaitsivat pääväylän kummassakin päässä, täytettiin tarkoituksenmukaisella reagenssikoostumuksella. Päälilevy laminoitiin
30 päällyksen muodostamiseksi painaumien ja väyläalueiden päälle, ja salvattiin puhkaisusulun muodostamiseksi
35

kunkin painauman (lukuun ottamatta viimeistä) ja siitä pääväylään johtavan väylän välille. Ensiksi kuitenkin pää-
 lilevyä käsiteltiin kaikkialta koronasyövyttimellä. Sitten
 edellä kuvatut (keksintö ja verrokkit) koetinreagenssikoos-
 5 tumukset sijoitettiin välittömästi riviin neljäksi vaihte-
 levaksi täpläksi käsitellylle pinnalle, jolloin kukin koh-
 ta käsitti 0,9 - 1,1 µl jäljempänä mainittua koostumusta.
 Sijoitettuja koostumuksia kuivattiin 30 sekunnin ajan il-
 mavirrassa huoneenlämpötilassa samalla, kun tuen vastak-
 10 kaista puolta kuumennettiin raudalla noin 95 °C:ssa.

Esimerkki 1

**Pesuosastot vain leimaosaston ja signaalimateriaa-
 liosaston välissä**

Kuvion 2 mukaisen suoritusmuodon esittelemiseksi
 15 valmistettiin 16 toistoa. Kunkin levyistä rakkulat 16
 edellä valmistetussa toistossa täytettiin reagensseilla
 esimerkkkitesteissä seuraavasti:

Rakkula (kuvio 7)

20	26C	varattu analyytin ruiskutukselle (n. 190 - 210 µl)
	30C	SA-HRP-konjugaatti (noin 350 µl)
	32C	pesuliuos (noin 235 µl)
	36C	pesuliuos (noin 350 µl)
	34C	leukoväri (noin 235 µl)

(Täten ylimääräistä pesumateriaalia käytettiin,
 jolloin se kuitenkin vaikutti vain rakkulan 5 erottami-
 seksi rakkulasta 2, eikä vaikuttanut rakkulan 2 erottami-
 seksi rakkulasta 1.)

Verrokkiesimerkiksi, joka muistuttaa EPA-julkai-
 30 sussa 381 501 esitettyjä (jolloin "pysäytysliuos"-osasto
 on jätetty pois; tämä vaihe on selvästi tarpeeton täsmäl-
 lisille lukemille), valmistettiin toinen 16 samanlaisen
 pussin sarja identtisesti esimerkkiin 1 nähden lukuun ot-
 35 tamatta, että ensimmäisen pesun ja SA-HRP-konjugaatin

asemat rakkuloissa 2 ja 3 ja keskinäiset määrät vaihdettiin, eli käytettiin 350 µl pesuliuosta ja 235 µl SA-HRP-liuosta.

Päälilevy laminoitiin ja suljettiin sitten tiiviisti kolmessa vaiheessa. Ensiksi "sandwich" puristettiin ja suljettiin tiiviisti kuumentamalla noin 149 °C:seen vain rakkuloiden ympärillä, jotka sisälsivät reagenssiluoksia, sekä jäterakkulan ympärillä. Näytteen vastaanottavien PCR-rakkuloiden, mukaan lukien puhkaisusulkujen, ja väylien muodostaminen saatettiin loppuun kuumentamalla testipakkaa tarkoituksenmukaisesti muotoiltujen kuumennusleukojen välissä noin 163 °C:ssa. Kolmas vaihe oli ympäryssaumojen muodostaminen testipakan ympärille, ja kaikkien rakkulan-ympäryssaumojen uudelleensinetöinti käyttäen päälilevylämpötilaa 199 °C pohjalevyn pysyessä ympäristön lämpötilassa. Valmiiseen testipakkaan (tai elementtiin) muodostetut väylät ja rakkulat sijaitsivat siten, että telan kulkeminen reagenssirakkulat sisältävän elementtiosan yli puhkaisisi peräkkäin rakkuloiden saumat ja pakottaisi reagenssin kuskatakin rakkulasta poistoväylään ja sitä pitkin pääväylään, joka johtaa sieppauskoettimet sisältävälle alueelle. Valmiiksi saatu elementti käännettiin siten, että sieppauskoetintäplät (talletukset) sisältävä päälilevy on valmiin elementin pohja koetintalletuksien ollessa oikeaoppisesti rinnan pääväylässä toteamisaseman muodostamiseksi. Neljä koetintäplää sijaitsivat eri asemissa pääväylässä useissa näytteissä.

Viimeinen jäteosasto, joka sijaitsi pääväylän päässä, oli suurempi kuin muut ja se oli varustettu absorbentilla jätenesteiden säiliöksi sekä esimerkissä 1 että vertailuesimerkissä.

Esimerkin 1 ja vertailuesimerkin valmiita pusseja käytettiin reagenssikoostumusten arvioimiseksi seuraavasti:

Rakkula kussakin testilaitteessa täytettiin (190 - 210 µl) 20X-laimennoksella edellä kuvattua PCR-tuotetta ja prosessoitiin seuraavasti:

Esimerkki 1

- 5 Analyytti esilämmitettiin 95 °C:seen 120 sekunniksi ja telan annettiin kulkea sen rakkulan ylitse sulun murta-
- miseksi ja liuoksen viemiseksi toteamisasemaan (koetintal-
- letukset). Analyyttiä ja koetinreagensseja hybridisoitiin
- 10 toteamisasemalla 42 °C:ssa 5 minuutin ajan samalla, kun SA-
- HRP-konjugaatti toisessa rakkulassa esikuumennettiin 65
- °C:seen. Telan annettiin kulkea konjugaattirakkulan ylitse,
- sulku rikottiin ja liuos ohjattiin toteamisalueelle ana-
- lyytin syrjäyttämiseksi. 5 minuutin kuluttua kolmas raku-
- 15 la, joka sisälsi ensimmäisen pesuliuoksen, joka oli esi-
- kuumennettu 55 °C:seen, rikottiin ja pesu ohjattiin totea-
- misasemalle ja pidettiin siellä 5 minuutin ajan samalla,
- kun toinen pesuliuos esikuumennettiin 55 °C:seen. Sitten
- rakkula, joka sisälsi toisen pesuliuoksen, rikottiin ja
- pesu ohjattiin toteamisasemalle. Lopuksi telan annettiin
- 20 kulkea rakkulan ylitsen, joka sisälsi värisignaalin muo-
- dostavan koostumuksen, ilman esikuumennusta ja sulku ri-
- kottiin, ja koostumus ohjattiin toteamisasemalle, jossa
- väripisteet luettiin 5 minuutin inkuboinnin jälkeen käyt-
- täen värikarttaa alla kuvatun mukaisesti. Väripisteet esi-
- 25 tetään taulukossa I sekä esitetään graafisesti kuviossa
- 5A.

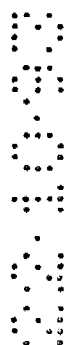
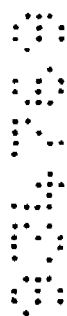
Vertailuesimerkki

- Analyytin sisältävä rakkula kussakin elementissä
- esikuumennettiin noin 95 °C:seen 120 sekunnin ajaksi, minkä
- 30 jälkeen telan annettiin kulkea sen ylitse sulun rikkomi-
- seksi ja liuoksen ajamiseksi alueelle, joka sisälsi neljä
- immobilisoitua koetinreagenssitalletusta eli kaksi verrok-
- kikoetinta ja kaksi HUT/HIV-koetinta, jotka oli sijoitettu
- paikoilleen liiman kanssa. Analyyttiä ja koetinreagensseja
- 35 hybridisoitiin toteamisasemassa 42 °C:ssa 5 minuutin ajan

samalla, kun pesuliuoksen sisältävä rakkula esikuumennet-
 tiin 55 °C:seen. Sitten telan annettiin kulkea pesuliuos-
 rakkulan ylitse sulun rikkomiseksi ja pesuliuoksen ohjaa-
 miseksi toteamisalueelle pääväylän puhdistamiseksi sekä
 5 sitoutumatta jääneen analyytin poistamiseksi toteamisalu-
 eelta. Sitten ilman esikuumennusta telan annettiin kulkea
 streptavidiini/piparjuuriperoksidaasi-konjugaattirakkulan
 ylitse rikkoen tämän sulku ja liuos ohjattiin toteamis-
 alueelle, jossa se sitoutuu immobilisoituun biotinyloituun
 10 analyyttiin 5 minuutin aikana. Tänä aikana toinen pesu-
 koostumus esikuumennettiin 55 °C:seen, minkä jälkeen rak-
 kulan sulku rikottiin telalla ja sen sisältö ohjattiin
 toteamisasemalle, jossa se syrjäytti sitoutumatta jääneen
 leiman. Lopuksi värisignaalin muodostavan koostumuksen
 15 sulku viimeisessä rakkulassa rikottiin telalla ja neste
 ohjattiin toteamisasemalle, jossa se syrjäytti toisen pe-
 suliuoksen. Värimuodostuksen koetintalletuksissa annet-
 tiin edetä 5 minuutin ajan, minkä jälkeen luettiin väri-
 tiheyspisteet. Kunkin koetintalletuksen väri arvioitiin
 20 vertaamalla märkäväritiheyttä värikarttaan, jossa 0 on ei-
 tiheyttä ja 10 on korkein tiheys. Väripisteet esitetään
 taulukossa II ja esitetään graafisesti kuvion 5B diagram-
 missa. (Kirjaimet "LTR" ja "ENV" taulukoissa I ja II
 edustavat vastaavasti verrokki-ei-tietokoetintalletuksia
 25 ja koetintalletuksia, jotka ovat komplementaarisia HIV-
 genomien analyytissä ENV-alueeseen nähden. Nämä edustavat
 kutakin 4 helmikeskuksesta toteamisosastossa. Vasemmalta
 oikealle virtaavan nesteen kohtaama ensimmäinen helmi oli
 "LTR". Toinen oli "ENV"; kolmas oli "LTR" ja lopuksi oli
 30 "ENV" oikeanpuoleisessa sarakkeessa.)

Taulukko I
Esimerkki 1 - HIV

	Toisto	LTR	ENV	LTR	ENV
	1	0,5	7	0,5	6,5
5	2	0	6,5	0	4
	3	0,5	6,5	0,5	6,5
	4	1	6,5	1	6,5
	5	1	6,5	1	6,5
	6	0,5	6,5	0,5	6
10	7	0,5	5	0,5	5,5
	8	0,5	6,5	0,5	6
	9	1	5	1	4
	10	0,5	5	0,5	5
	11	0,5	7	0,5	6,5
15	12	0,5	6	0,5	6
	13	0,5	7	0,5	6,5
	14	0,5	6	0,5	7
	15	0,5	2	0	2
	16	0,5	<u>7</u>	0,4	<u>6,5</u>
20	Keskiarvo		6,0		5,69



Taulukko II

Vertailuesimerkki - HIV

	Toisto	LTR	ENV	LTR	ENV
5	1	0,5	5	0,5	5,5
	2	0,5	2	0,5	6
	3	0,5	6,5	0,5	5,5
	4	1	6	1	6
	5	0,5	2	0,5	2
10	6	1	7	1	6
	7	1	7	1	5
	8	1	7	1	6
	9	1	3	1	7
	10	1	7	1	6
15	11	0,5	1	0,5	4
	12	1	7	0,5	6
	13	1	7	1	6,5
	14	0,5	6	1	4
	15	1	6,5	1	6
20	16	1	7	1	5,5
	Keskiarvo		5,44		5,44

25 Kuten on selvästi ilmeistä, etenkin verrattaessa kuvioita 5A ja 5B, pesuvaiheen eliminointi sen jälkeen, kun vahvistettu nukleiinihappomateriaali oli hybridisoitu toteamiskeskukseen, ja ennen leimareagenssin lisäämistä ei haitannut tuloksia. Itse asiassa saatiin parempia tuloksia. Kvantitatiivisesti tämä voidaan nähdä myös ottamalla keskiarvo toisista ja neljänsistä helmistä "ENV" esimerkissä 1 kaikille 16 toistolle, ja vertaamalla näitä vertailuesimerkkiin. Esimerkille 1 keskiarvo oli 6,0 ja 5,69, kun taas vertailuesimerkille se oli 5,44 kummassakin tapauksessa.

30 Edeltävät tulokset eivät rajoitu nimenomaiseen määrittelykseen - ne ilmenevät samoin määritettäessä esimerkiksi CMV:tä (sytomegalovirus). Tästä syystä oligonukleo-

tidisekvenssejä ei ole spesifisesti identifioitu, koska arvellaan, että on epäoleellista, mitä määrittystä käytetään sen osoittamiseksi, että yksi pesu tai molemmat pesut voidaan eliminoida.

5 On osoitettu, että esimerkin 1 tuloksiin verrattavia tuloksia saadaan, jos toinen pesuosasto jätetään pois, jolloin saadaan kuviossa 1 esitetyn mukainen pussi. Toisin sanoen tällaisessa pussissa pesuosasto ja -vaihe on vain leimaosaston ja -vaiheen (jossa käytetään SA-HRP:tä) ja
10 signaalimateriaaliosaston ja -vaiheen (jossa käytetään leukoväriä ja H_2O_2 :ta) välissä.

Vastaavasti on osoitettu, että tällaisella 4-osastoisella pussilla, jossa on vain yksi pesuosasto, joka kuitenkin sijaitsee nukleiinihappomateriaalin vahvistamiseksi
15 käytetyn reaktio-osaston ja leimaosaston välissä, saadaan tuloksia, jotka ovat verrattavissa tavanomaiseen rakenteseen, jossa on pesuosasto (ja -vaihe) sekä reaktio-osaston (hydridisaatiovaihe) että leimaosaston (leimausvaihe) jälkeen.

20 Esimerkki 2

Esimerkin 1 mukaisten pussien vertaaminen pusseihin, jotka eivät sisällä pesuliukuksia

Valmistettiin kaksi sarjaa PCR-analyysipusseja
esimerkin 1 menettelyiden mukaan seuraavin poikkeuksin:

25 1. Valmistettiin kolmas koetinkoostumus esimerkin 1 mukaisilla menettelyillä sisältämään sekvenssi, joka on komplementaarinen sekvenssiin HUT/HIV-DNA:n GAG-alueelta.

2. Vain yksi täplä (talletus) kustakin 3 koetimesta sisällytettiin kuhunkin elementtiin järjestyksessä
30 (1) uusi, edellä kuvatun mukainen koetin GAG-alueelta, (2) verrokkikoetin esimerkistä 1, ja (3) esimerkin 1 mukainen reagenssikoetin.

3. Yksi pussisarja oli 5-rakkulaiset pussit
esimerkin 1 käänteisessä pesumuodossa (SA-HRP-konjugaatti
35 toisessa rakkulassa ja pesu kolmannessa rakkulassa) ja

tuon sarjan pusseja prosessoitiin kuten kuvattiin esimerkissä 1.

4. Toisessa pussisarjassa käytettiin vain 3 reagenssiosastoa ja ei käytetty pesuosastoja kuten esitetään kuviossa 3. Ne sisälsivät samat koostumukset, mukaan lukien analyyttikoostumus poolista, ja samat määrät kuin vastaavat koostumukset ensimmäisessä elementtisarjassa esimerkissä 1 (sarja, jossa pesumuoto oli tavanomainen) ja rakkulat olivat seuraavassa järjestyksessä:

10

Rakkula (kuvio 7)

Sisältö

26C

PCR-analyytti

30C

SA-HRP

32C

värinmuodostava

15

toteamiskoostumus

Loput rakkulat tai osastot jätettiin tyhjiksi.

Pussit toisessa sarjassa prosessoitiin seuraavasti:

Analyytti PCR-rakkulassa esikuumennettiin 95 °C:seen

20

120 sekunniksi, ja telan annettiin kulkea rakkulan ylitse sulun rikkomiseksi ja analyytin ohjaamiseksi 3 koettimen talletukseen toteamisasemassa. Hybridisaation 42 °C:ssa

annettiin kestää 5 minuutin ajan samalla, kun SA-HRP-liuos toisessa rakkulassa esikuumennettiin 65 °C:seen. Sitten

25

telan annettiin kulkea toisen rakkulan ylitse sulun rikkomiseksi ja liuos ohjattiin väyliä pitkin toteamisasemaan.

Konjugaattia inkuboitiin toteamisasemassa 5 minuutin ajan, minkä jälkeen telan annettiin kulkea värinmuodostavan to-

30

teamisdispersion sisältävän rakkulan ylitse ilman esikuumennusta sulun rikkomiseksi ja dispersion ohjaamiseksi toteamisasemaan syrjäyttämään SA-HRP. Kun väridispersiota oli inkuboitu 5 minuutin ajan toteamisasemassa, väripisteet luettiin käyttäen värikarttaa kuten esimerkissä 1.

Väripisteet kummallekin elementtisarjalle on esitetty tau-

lukoissa IIA ja IIB ja esitetään graafisesti kuvioiden 6A ja vastaavasti 6B diagrammeissa.

5 Tulostiedot osoittavat, että 3 -rakkulaisella pussirakenteella saadaan positiivisia signaaleja, jotka ovat verrattavissa tuloksiin esimerkin 1 mukaisella 5-rakkulaisella pesupussirakenteella; jolloin kuitenkin saadaan hie-
 10 man kohonneet signaalit ei-tieto- (verrokki-) helmillä. Tätä voidaan vähentää tai se voidaan poistaa 3-rakkulaisessa rakenteessa käyttämällä suurempaa tilavuutta värin-
 muodostavaa toteamisdispersiota. 3 -rakkulaisella raken-
 teella on mahdollista käyttää vähemmän reagensseja, pie-
 nentää yksikkövalmistuskustannuksia, pienentää pussivaras-
 tointitilaa, lyhentää prosessointiaikoja ja käyttää pie-
 nempää, vähemmän mutkikasta prosessoria.

15

Taulukko IIA

5 rakkulaa kuten esimerkissä 1

Toisto	GAG	ENV	LTR
1	7	7	0,5
20 2	7	7	1
3	7,5	7	1
4	7,5	7	0,5
5	7	7	1

25

Taulukko IIB

3-rakkulaisen pussin tulostiedot

Toisto	GAG	ENV	LTR
1	7	7	2
2	7,5	7	2
30 3	7	7	2,5
4	7,5	7	2,5

35

Tässä julkistettua keksintöä voidaan harjoittaa minkä tahansa elementin puuttuessa, jota ei tässä spesi-
 fisesti julkisteta.

Patenttivaatimukset:

1. Menetelmä vahvistetun nukleiinihappomateriaalin toteamiseksi hybridisoimalla tällainen materiaali toteamiskeskukseen, joka käsittää ainakin yhden immobilisoidun koettimen, leimaamalla hybridisoitu ja nyt immobilisoitu nukleiinihappomateriaali tuomalla keskukseen leima, joka on signaalimateriaali tai joka aktivoi signaalimateriaalin, signaalin tuottamiseksi, minkä jälkeen signaalimateriaali lisätään keskukseen todettavan signaalin tuottamiseksi,

t u n n e t t u siitä, että joko leimausvaihetta käytetään välittömästi hybridisaatiovaiheen jälkeen edellyttämättä välissä sijaitsevaa pesuvaihetta, tai lisäysvaihetta käytetään välittömästi leimausvaiheen jälkeen edellyttämättä välissä sijaitsevaa pesuvaihetta.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että se edelleen sisältää vaiheen, jossa keskus pestään pesunesteellä, vain nukleiinihappomateriaalin hybridisaatiovaiheen ja leimaamisen leimalla vaiheen välissä.

3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että se sisältää edelleen vaiheen, jossa keskus pestään pesunesteellä vain leimaamisen leimalla vaiheen ja signaalimateriaalin lisäysvaiheen välissä.

4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että sekä leimausvaihetta käytetään välittömästi hybridisaatiovaiheen jälkeen ilman välissä sijaitsevaa erillistä pesuvaihetta että lisäysvaihetta käytetään välittömästi leimausvaiheen jälkeen ilman välissä sijaitsevaa pesuvaihetta.

5. Patenttivaatimuksen 1, 2, 3 tai 4 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että leima on entsyymi.

6. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että se sisältää edelleen vaiheen, jossa

vahvistettu materiaali siirretään keskukseen ennen hybridisäätövaihetta.

5 7. Laite nukleinihappomateriaalin vahvistamiseksi ja toteamiseksi käyttämällä ainakin yhtä kohdesäiettä templaattina, jolloin laite käsittää reaktio-osaston nukleinihappomateriaalinäytteen vahvistamiseksi, toteamiskeskuksen vahvistetun nukleinihappomateriaalin toteamiseksi ja varasto-osastoja, jotka sisältävät leiman ja signaalimateriaalia, jotka kykenevät yhdessä muodostamaan
10 todettavan signaalin, ja väyliä osastojen yhdistämiseksi juoksevasti keskukseen,

t u n n e t t u siitä, että laite sisältää edelleen ei enempää kuin yhden pesuosaston, joka sisältää pesunestettä, joka oleellisesti ei sisällä sieppaus-, leima-
15 ja signaalinmuodostusreagensseja, joita käytetään varasto- tai reaktio-osastoissa, ja ei enempää kuin yhden väylän, joka yhdistää pesuosaston toteamiskeskukseen,

jolloin korkeintaan yhtä pesuvaihetta käytetään vaihesarjassa, joka käsittää osastojen sisältöjen tyhjentämisen ja liikuttamisen toteamiskeskukseen.
20

8. Patenttivaatimuksen 7 mukainen laite, t u n n e t t u siitä, että laite ei sisällä lainkaan pesuosastoa, joka sisältää pesunestettä, joka oleellisesti ei sisällä sieppaus-, leima- ja signaalinmuodostusreagensse-
25 ja, joita käytetään varastointi- tai reaktio-osastoissa.)

9. Patenttivaatimuksen 7 mukainen laite, t u n n e t t u siitä, että kaikki osastot, toteamiskeskus ja väylät on salvattu laitteen ympäristöön vuotamista vastaan siirtymiskontaminaation estämiseksi.
30

10. Patenttivaatimuksen 7, 8 tai 9 mukainen laite, t u n n e t t u siitä, että leima on entsyymi.

00-10-93 036783

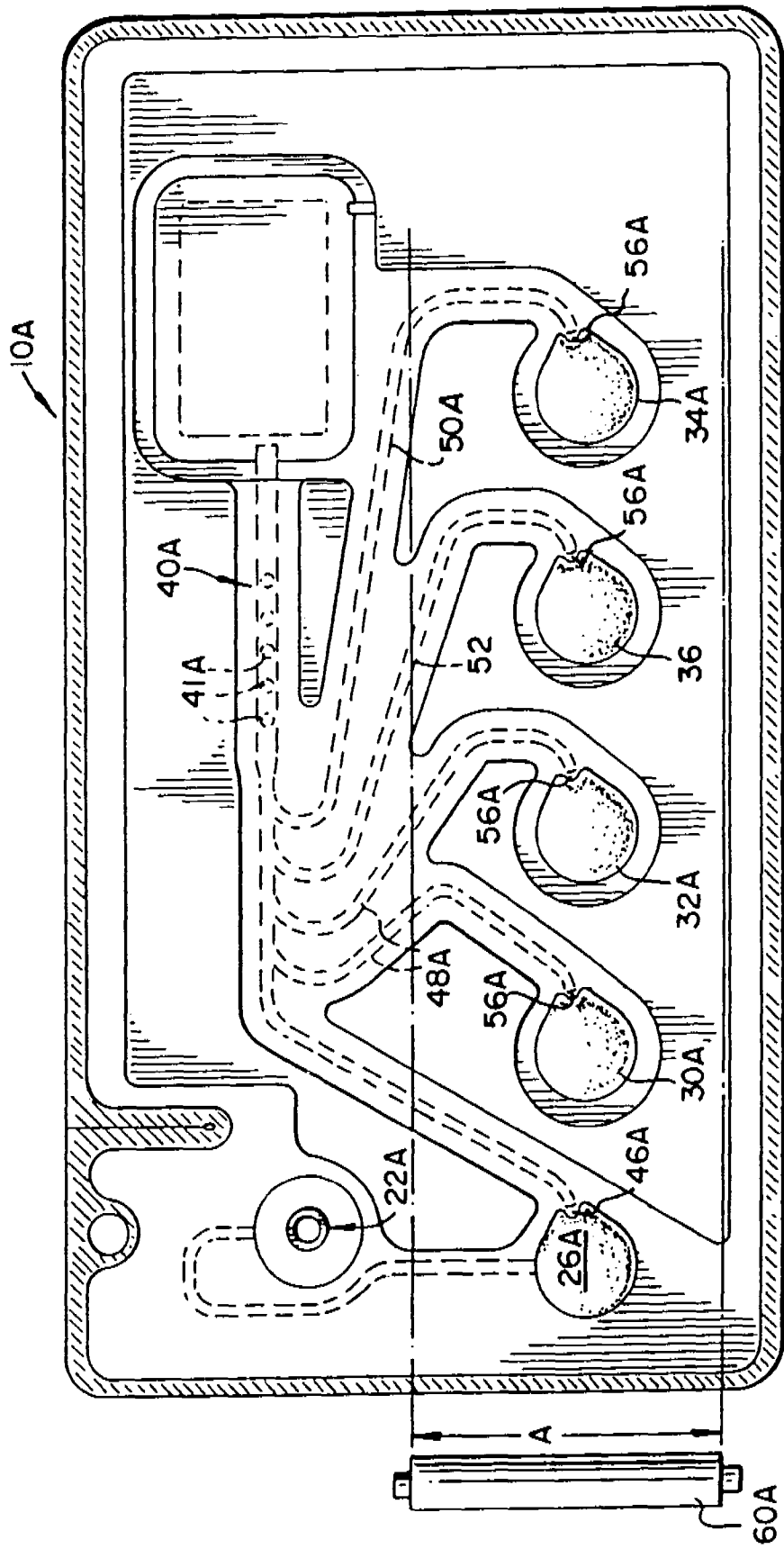


FIG. 2

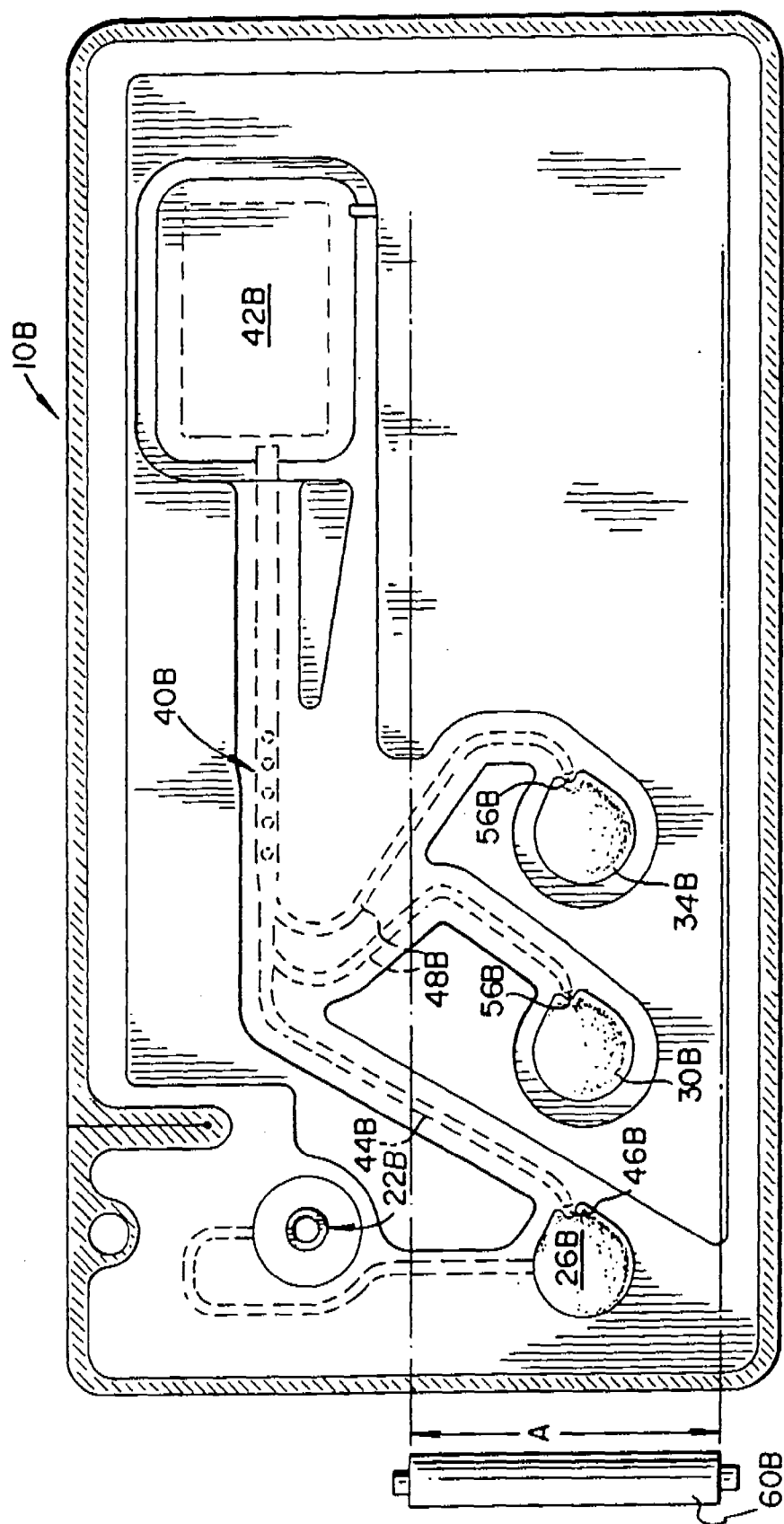


FIG. 3

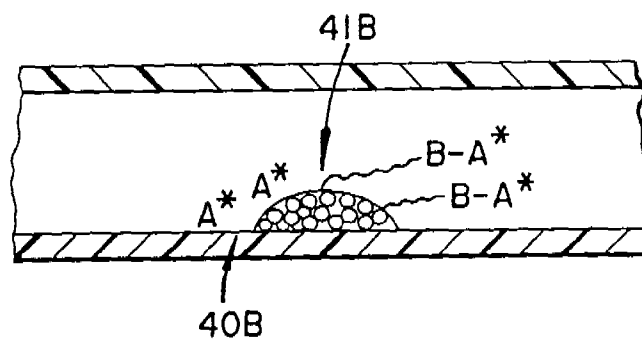


FIG. 4A

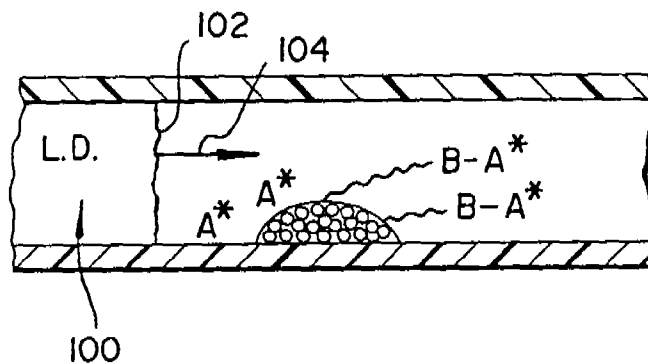


FIG. 4B

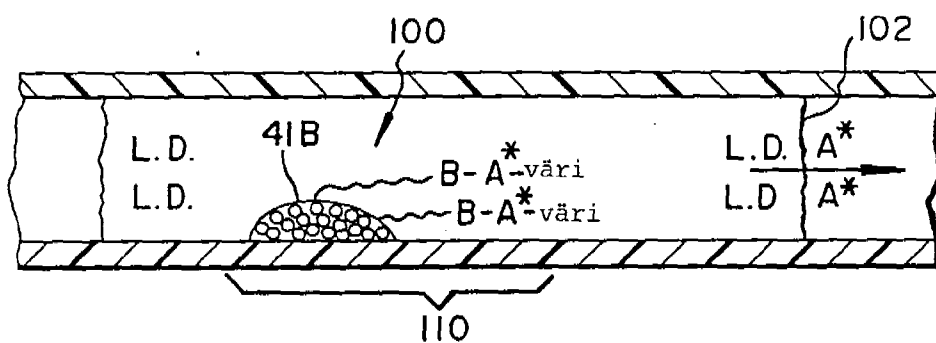


FIG. 4C

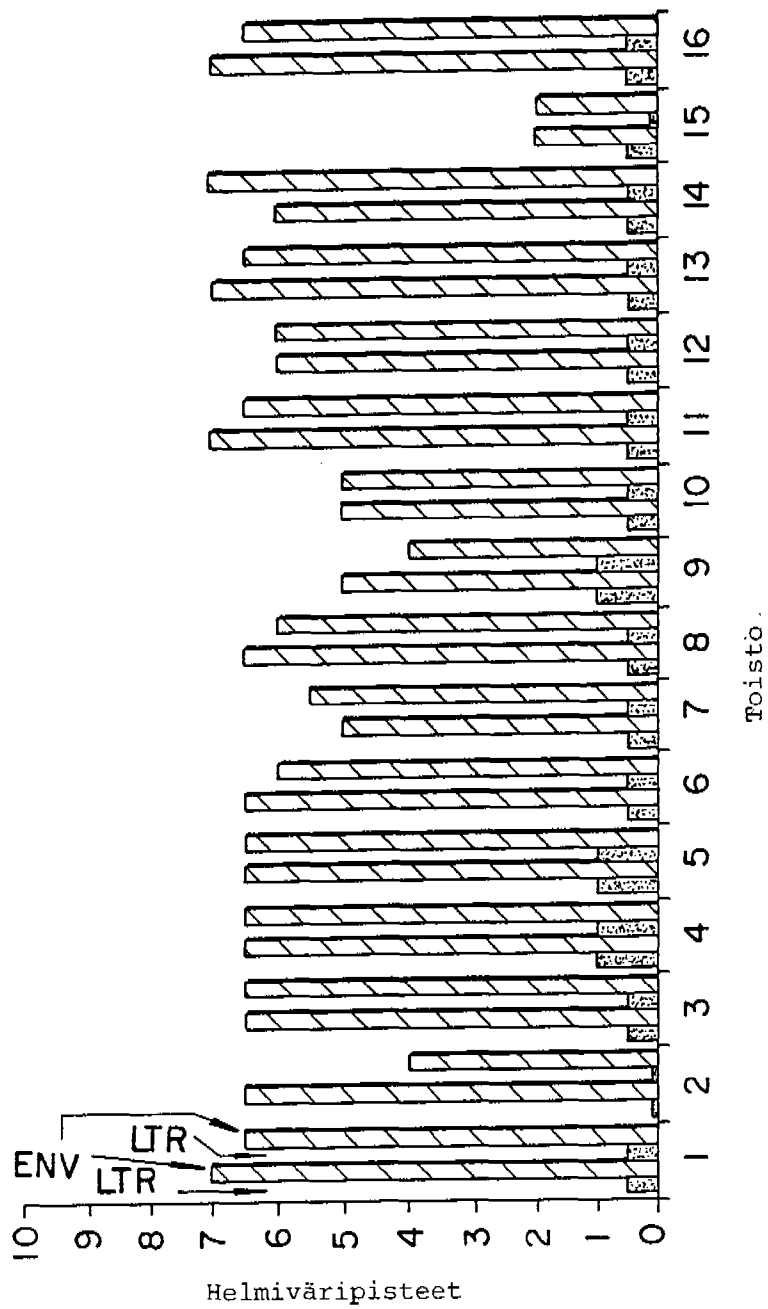


FIG. 5A

6 003.003 003.003

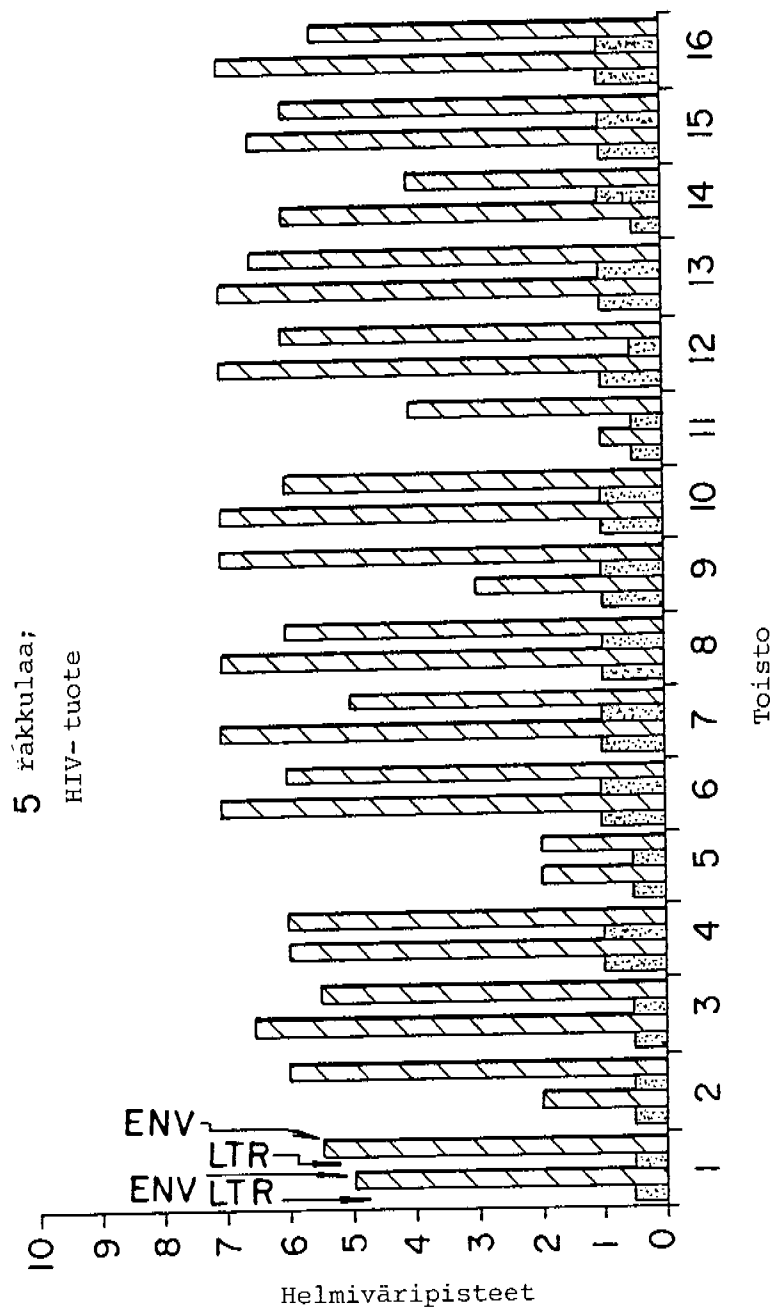


FIG. 5B

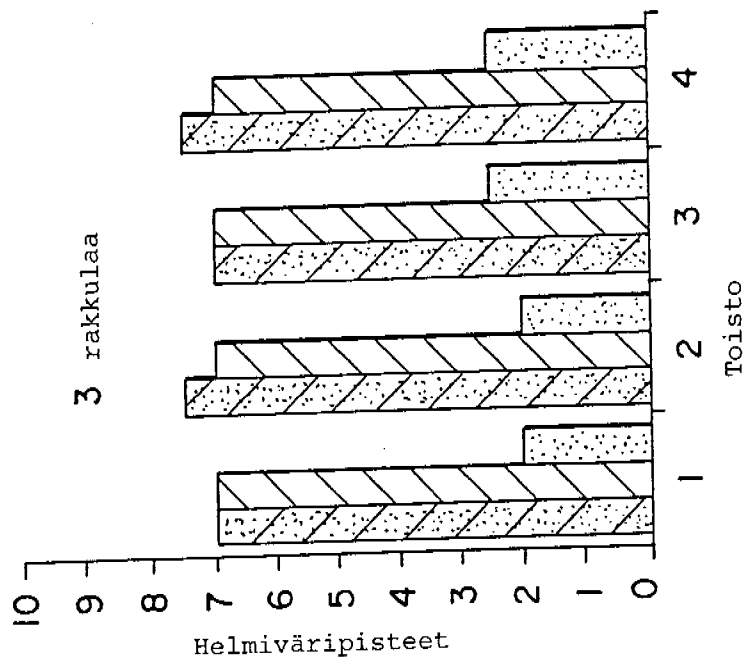


FIG. 6B

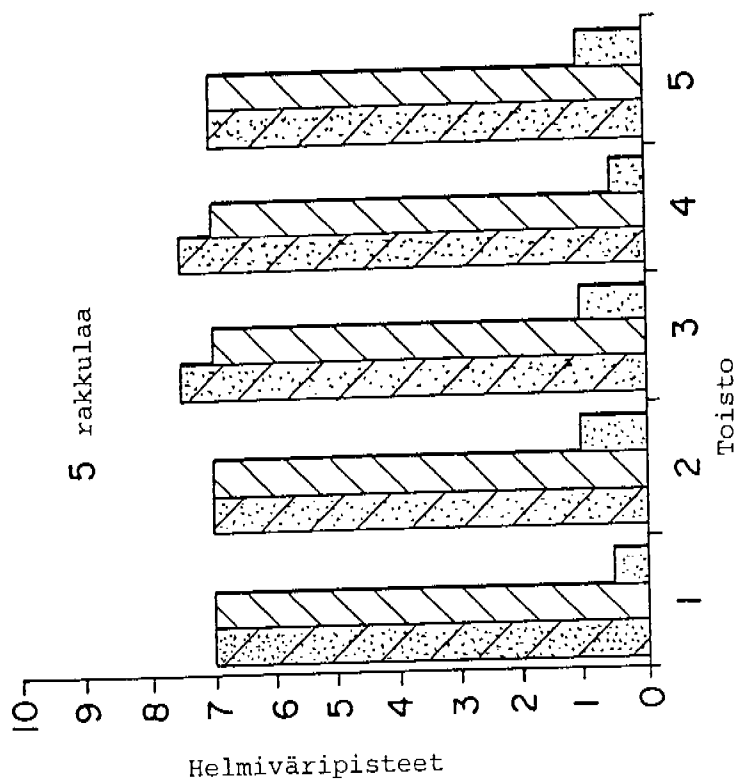


FIG. 6A

33.10.93 931789

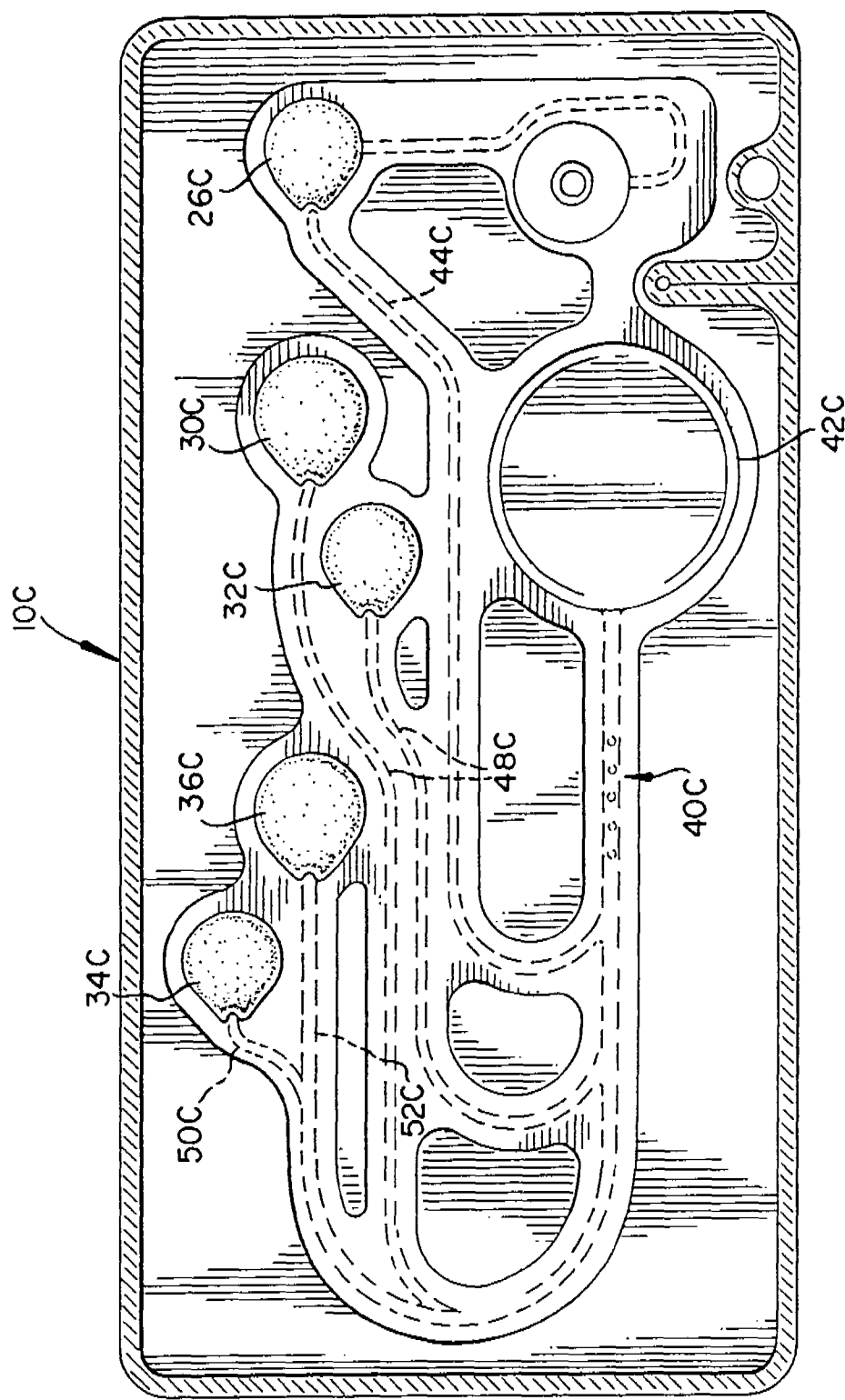


FIG. 7

HAKEMUSNUMERO	LUOKITUS
934669	C12Q 1/68
	☐ jatkuu kääntöpuolella

TUTKITTU AINEISTO
Patenttivirastojen julkaisut (FI, SE, NO, DK, DE, CH, EP, WO, GB, US) viraston julkaisukokoelmasta luokista
☐ jatkuu kääntöpuolella

VIITEJULKAISUT		
Kategoria^{*)}	Julkaisun tunnistetiedot	Koskee vaatimuksia
	WO-H-9216659, C12Q 1/68	
	EP-H-318255, G01N 21/03	
	EP-H-381501, B01L 3/00	
^{*)} X Patentoitavuuden kannalta merkittävä julkaisu yksinään tarkasteltuna Y Patentoitavuuden kannalta merkittävä julkaisu, kun otetaan huomioon tämä ja yksi tai useampi samaan kategoriaan kuuluva julkaisu A Yleistä tekniikan tasoa edustava julkaisu, ei kuitenkaan patentoitavuuden este		
Päiväys	Tutkija	
10.10.2000	Pirkko Karinen	