



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

202 360

(11) (B1)

(51) Int. Cl.³

B 01 J 13/00

(22) Přihlášeno 31 10 78
(21) PV 7100-78

(40) Zveřejněno 30 04 80

(45) Vydáno 30 08 82

(75)

Autor vynálezu

ČECH MILAN, Ing., CSc. a
DOLEŽÍLEK BOHUMIL, Ing., Praha

(54) Příčná řezačka gelů pro diskovou elektroforézu

1

Vynález se týká příčné řezačky gelů pro diskovou elektroforézu.

Jednou z nejcitlivějších separačních metod soudobé biochemie a molekulární biologie je soubor metod na principu gelové elektroforézy, která umožňuje ve svých různých modifikacích separaci ionizovatelných makromolekul lišících se od sebe jednou ionizovanou skupinou v množství miligramovém až pikogramovém. Další modifikace umožňují dělit makromolekulární směsi podle molekulové váhy, izoelektrického bodu atd. Neužívanější forma těchto metod je tzv. disková forma, kdy akrylamidové gely (2,4 až 20 %) nebo agarosové gely (1 až 7 %) jsou odlévány do válcovité formy v trubicích o průměru 0,5 až 10 mm a délky 5 až 20 cm.

K realizaci diskové elektroforetických analýz je však třeba soubor přístrojů, mimo jiné i příčné řezačky gelů, pomocí které lze provést příčné rozřezání válce gelu na segmenty obvykle asi 1 mm silné.

Přitom rozřezávání gelů je stále zdlouhavé, vyžaduje soustředěnou práci jednoho až dvou kvalifikovaných a zkušených pracovníků a perspektivy na mechanizaci nebo automatizaci této zdlouhavé operace jsou malé.

Všechny dosud známé příčné řezačky gelů lze zhruba zařadit do šesti konstrukčních typů.

— Strunové řezače (na principu kráječe vajčinek natvrdo). Osnova ocelových strun v napínacím rámu protne jedním pohybem celý gelový váleček ve vhodném lůžku. Říd-

2

ké gely se musí zpevnit zmrazováním. Nevýhody: gely se musí zmrazovat různou dobu na různou teplotu podle jejich složení. Nelze řezat velmi mělké a elastické gely. Zařízení je poruchové, nepřesné a nespolehlivé.

— Řezače s hřebenovou sestavou čepelek, mezi nimiž jsou vloženy distanční planžety. Gelový váleček se zmrazí a v prořezovaném lůžku se protne po celé délce sestavou čepelek (až 100 i více). Konstrukce je vhodná zejména pro koncentrované gely. Nevýhody: Řídké gely se musí ztužovat zmrazením, což je spojeno s nevratnými změnami v geometrii gelu. Během řezání může docházet k tříštění zmrazených gelů, k deformaci čepelek. V plánu pokusů je třeba počítat s nezdarným řezáním. Čištění, údržba a seřízení je pracné a zdlouhavé.

— Mikrotomové řezače. Jako řezacího ústrojí se používá ručních mikrotomů nebo jejich modifikací. Posun gelového válečku je buď mechanický (výtlačný píst spojený se šroubovým posunem) nebo hydraulický (precizním mikročerpádem). Nevýhody: Řídké gely je nutné opět zmrazovat. Přijatelně přesných řezů se docílí jen u mechanicky stabilních gelů o vyšší koncentraci gelu a vyšším stupni zesíťování.

— Gilotinové řezače. Co do vhodnosti, přesnosti i svých nevýhod odpovídají zhruba předchozímu typu C.

— Macerační děliče. Lze jimi frakcionovat gely v poměrně širokém rozmezí kon-

centrací v nezmrazeném stavu. Nevýhody: Zařízení je poměrně drahé, náročné na prostor, řezání je zdoluhavé. Nelze jím rozřezat gel po celé jeho délce.

— Řezače s koncentrickým řezacím ústrojím (irisovou clonou). Představují významný pokrok pojetí mechanismu řezání gelů. Posun gelů je opět mechanický — vytlačným pístem a šroubem. Gely se nemusí zmrazovat. Nevýhody: Nejchoulostivější operací je zde podélný transport gelového válečku k řezacímu ústrojí. Lokálními změnami v tření a adhezí gelu k vodicímu žlábků nebo trubici dochází u řídkých gelů k deformaci a vybočení a tím k nepravidelným řezům (tutéž nevýhodu mají všechny řezačky gelů s mechanickým posunem). Při řezání irisovými clonami jsou řezné plochy konvexní nebo konkávní. Irisové clony z konstrukčních důvodů nelze zcela uzavřít a při řezání zejména koncentrovanějších gelů zůstává segment spojený s gelem za nedoříznutou středovou stopkou a ztěžuje odběr jednotlivých řezů pro izotopovou analýzu.

Z uvedeného vyplývá, že dosud nebyla nalezena konstrukce řezačky vhodná pro všechny typy používaných gelů. Zatímco většina popsaných typů je schopná rozřezávat koncentrované gely, pro více používané řídké gely je konstrukce nevyhovující a gely je nutno při řezání ztužovat zmrazováním. Rovněž přesnost, reprodukovatelnost a spolehlivost je u dosavadních typů sporná. Tak například u irisové řezačky se uvádí, že řez o síle 1 mm lze na ní získat s přesností 13 až 34 % podle zkušenosti a zručnosti operátora. Je to příliš vysoká chyba zaváděná při analytickém zpracování elektroforetických gelů, podmíněná navíc výraznými individuálními chybami. Žádný z dosud známých typů řezače polyakrylamidových nebo agarosových gelů se dosud nepřiblížil minimálním požadavkům, zejména co do přesnosti a reprodukovatelnosti, která by odpovídala třídě přesnosti ostatních analytických metod používaných při elektroforetických metodách v gelových nosičích.

Uvedené nevýhody z velké části odstraňuje příčná řezačka gelů podle vynálezu, jejíž podstatou je, že k nosné desce je ve svislé poloze upevněna vodicí trubice, na jejímž horním konci je nasazena nádobka, která uvnitř na spodním konci je zúžena a dotýká se řezacích planžet, pod kterými se nachází miska se zvýšeným okrajem, spojená raménkem s posuvným a otočným pouzdem a šroubovým regulačním zařízením tloušťky řezu, přičemž řezací planžety jsou pevně spojeny s unášecími kotouči, které jsou ovládány pákou.

Výhody příčné řezačky gelů podle vynálezu jsou následující:

— Řezačku podle vynálezu lze použít na všechny typy gelů — řídké, křehké, tuhé apod. U řídkých gelů není třeba zmrazení gelu.

— Tloušťka řezu je nastavitelná ve větším rozsahu oproti stávajícím řezačkám gelů.

— Je možno řezat libovolně dlouhé gelové válečky a provádět libovolný počet řezů za sebou, neboť počet řezů není konstrukčně omezen.

— Řezací ústrojí je nůžkového systému a nezpůsobuje bez ohledu na konzistenci gelu deformaci řezné plochy jako je tomu například u gilotinových nebo irisových řezaček s otáčivými segmenty.

— Ve srovnání s dosavadními postupy je manipulační doba k získání a k zpracování jednoho řezu podstatně kratší než u dosavadních způsobů.

— Hlavní výhoda je však ve způsobu posunu válečků gelu k řezacímu ústrojí, neboť ten se děje hydrostaticky. Nedochází k deformaci gelu jednostranným působením sil a váleček je řezán za konstantních tlakových podmínek, což nesplňuje většina stávajících typů řezaček. U dosavadních způsobů řezu gelových válečků se posun uskutečňuje jednosměrným působením síly na gelový váleček, například jen z čelní strany.

Příčná řezačka gelů podle vynálezu je tedy založena na novém principu transportu. Gel je při řezání vertikálně ponořen do vhodné kapaliny ve vodicí trubici. Konstantní hydrostatický tlak, působící na gelový váleček, dává sílu potřebnou k posunu. Stroj je vybaven jednodušším a přitom dokonalejším soustředným řezacím systémem.

Řezačka se skládá z tvarované vodicí trubice z teflonu, která je na svém horním konci nálevkovitě rozšířena a vodotěsně připojena k válcovitému zásobníku o velkém průměru. Vodicí trubice má vnitřní světlost větší než je průměr řezaného gelu. Na spodním konci je trubice pozvolně zúžená na průměr vedeného gelu a zastává zde funkci těsnicí. Spodní ústí trubice je spojeno s řezacím mechanismem, který je tvořen nůžkově se pohybující dvojicí řezacích planžet, vybroušených do tvaru V. Řezací mechanismus se svou funkcí podobá čtyřplanžetové irisové cloně s úplným uzavěrem otvoru.

Řezaný gel se zavede do vodicí trubice a převrství se vodným roztokem hydrofilního polymeru o specifické hmotnosti vyšší než má gel. Potom se dolije tolik roztoku, aby jeho hladina byla v zásobníku. Úbytkem gelu při řezání klesne hladina roztoku jen nepatrně o méně než 1 % výšky kapaliny. Během řezání se tedy prakticky nemění hydrostatický tlak na gel ve spodním ústí vodicí trubice. Po otevření nožů sklouzne a dosedne řezaný gel svým čelem na otáčivý stolek se zvýšeným okrajem, jeho vertikální vzdálenost vůči rovině nožů se nastaví stavčí matkou na stojanu řezačky. Tím se zvolí požadovaná tloušťka řezů. Sevřením řezacích nožů se odřízne vyčnívající část gelu a současně se tak uzavře vodicí trubice. Dosedací stolek se pak otočí, odtransportuje odříznutý segment gelu mimo řezačku a gel

se přenese špachtlí do zkumavky nebo do scintilační lahvičky k měření.

Stojan řezačky je připevněn k vaničce, která dává systému stabilitu a zabraňuje úniku případných stop radioaktivního materiálu.

V řezačce lze frakcionovat řezáním všechny druhy užívaných gelů, tj. polyakrylamidové gely o koncentraci 2,2 až 20 %, agarosové gely o koncentraci 0,5 až 7 %.

Tloušťku řezů lze u stávajícího prototypu nastavit v rozmezí 0,3 až 5 mm.

Konstantních a reprodukovatelných řezů se docílí pokud hydrostatický tlak na gel vytváří roztok rozpustného polymeru o relativně vysoké molekulové váze a specifické hmotnosti vyšší než má řezaný gel. Vhodný je syntetický polymer sacharosy o mol. hmotnosti 400 000. Potřebnou koncentraci roztoku lze empiricky stanovit podle flotace gelu.

Roztok, který vytváří hydrostatický tlak, má dosahovat výšky 130 až 150 mm od roviny řezacích nožů a jeho hladina se musí nacházet v zásobníku o dostatečně velkém vnitřním průměru. Malý pokles hladiny způsobený úbytkem gelu ve vodicí trubici neovlivňuje signifikantně reprodukovatelnost řezu.

Řezačku lze vybavit sadou snadno vyměnitelných vodicích trubic pro zpracování gelů různých průměrů nebo větších délek.

Příčná řezačka gelů podle vynálezu se skládá z podstavce, který tvoří vana, dále stojanu a nosné desky, na které je připevněna vodicí trubice. Její zúžený spodní konec je uzavřen dvojicí řezacích planžet. Nůžkový pohyb planžet je ovládán pákou přes unášecí kotouč s kolíkem, který zapadá do výřezu v druhém kotouči. Pod ostřími řezacích planžet, vybroušených do tvaru V se v ose vodicí trubice nachází miska se zvýšenými okraji. Na horním konci vodicí trubice je upevněna nádoba pro vodný roztok hydrofilního polymeru o specifické váze vyšší než má gel. Ve stojanu je uloženo šroubové regulační zařízení, kterým se nastavuje tloušťka řezů gelu.

Příčná řezačka gelů pro diskovou elektroforézu podle vynálezu je schematicky znázorněna na přiloženém výkresu, kde na obr. 1 je celkový nárysný řez, na obr. 2 půdorysný řez A—A, na obr. 3 půdorysný řez B—B.

Příčná řezačka gelů dle vynálezu sestává z vany 24, tvořící zároveň podstavec řezačky. Na ní je připevněn pomocí šroubu a matice 22 stojan 11 přístroje s nosnou deskou 20. V dolní části stojanu 11 je umístěna pružina 23, krytá pouzdrům 13, opírající se ve spodní části o podložku 25 a která v horní

části tlačí vzhůru pouzdro 10. Pohyb pouzdra 10 je omezen v horní části stojanu 11 šroubovým regulačním zařízením 18 tloušťky řezu. Šroubové regulační zařízení 18 tloušťky řezu se opírá o kolík 17, který je zalisován do pouzdra 10. Poloha šroubového regulačního zařízení 18 je aretována maticí 19. K hornímu konci stojanu 11 je připevněna svěrným šroubem 21 nosná deska 20, v jejímž středu je zašroubována vodicí trubice 1, na jejímž horním konci je nasazena nádoba 2 pomocí matice 3. Spodní konec 28 trubice 1 se dotýká řezacích planžet 4, jejichž pohyb je ovládán unášecími kotouči 5 s kolíkem 7 a které jsou ovládány pákou 6. Ostří řezacích planžet 4 jsou vybroušeny do tvaru V. Řezací planžety 4 jsou vedeny vodicí 8. Výstupek 29 ve vodicí 8 omezuje pohyb raménka 16, k němuž je připevněna miska 14 a které je ovládáno pákou 12. Na miskou 14 dosedá čelo řezaného gelu při rozvření řezacích planžet 4, přičemž vzdáleností 14 od roviny řezacích planžet 4 je dána tloušťka uříznutého plátku gelu. Miska 14 má zvýšený okraj, který zabraňuje sklouznutí uříznutého plátku gelu při oddálení misky 14 od řezacích planžet 4.

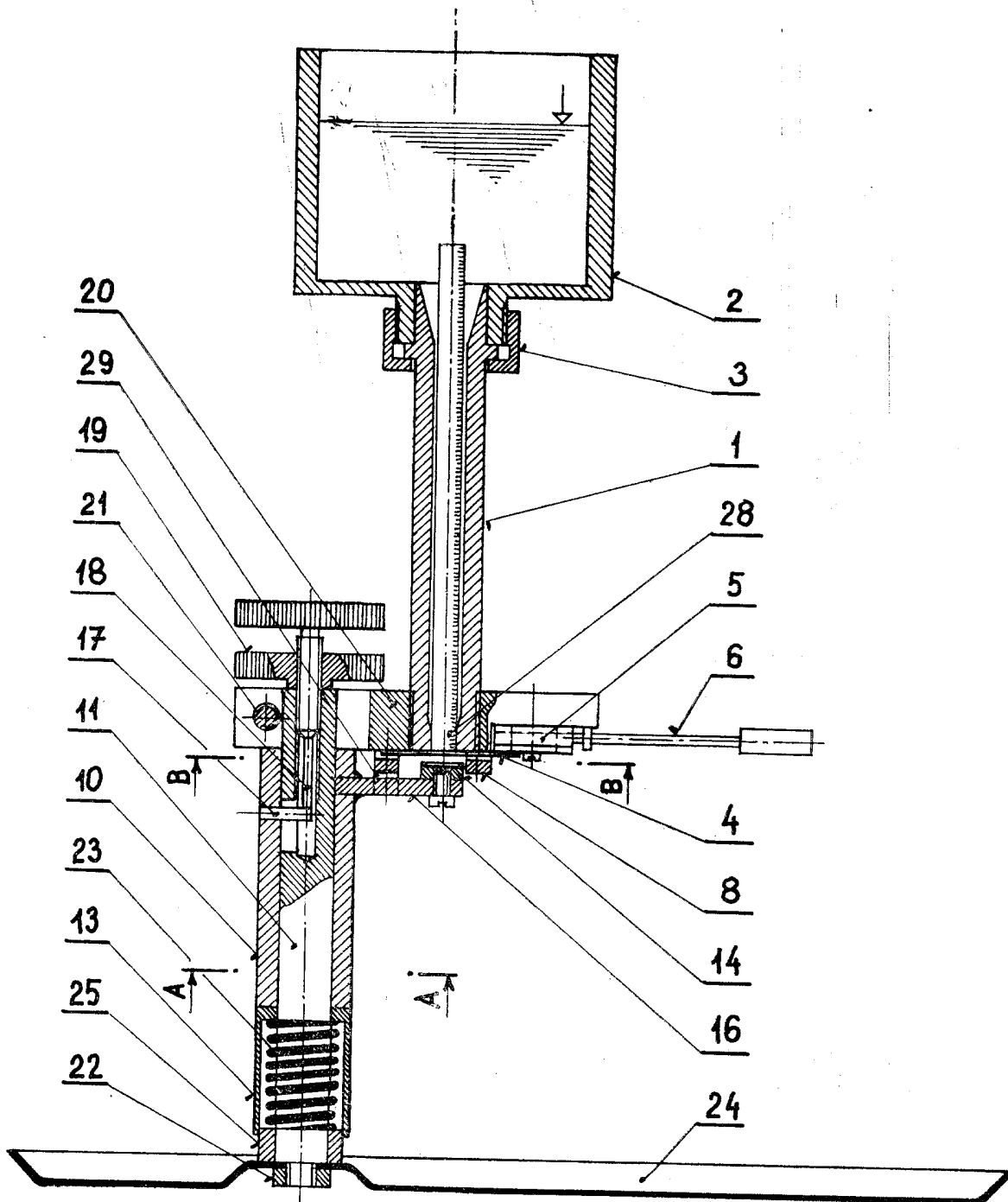
Řezací mechanismus se přestaví tak, aby řezací planžety 4 zakryly otvor zúženého spodního konce 28 vodicí trubice 1. Řezaný gel se zavede do vodicí trubice 1 a převrství se vodným roztokem hydrofilního polymeru o specifické váze vyšší než má gel. Úbytkem gelu následkem řezání poklesne hladina jen nepatrně. Konstantní hydrostatický tlak, působící na gelový váleček dává sílu potřebnou k posunu, přičemž vodicí trubice 1 má vnitřní světlost větší než je průměr gelu a na spodním konci 28 je trubice 1 zúžena a zastává funkci těsnění. Řezací planžety 4 v otevřené poloze umožňují posuv gelového válečku až na doraz k misce 14 a během uzavírání odříznou gelový plátek a uzavřou zespodu vodicí trubici a umožní otočení misky 14 a sejmutí gelového plátku, přičemž jeho tloušťka je regulována nastavením vzdálenosti misky 14 od řezacích planžet pomocí šroubového regulačního zařízení 18. Během řezání se tedy prakticky nemění hydrostatický tlak na gel ve spodním konci 28 vodicí trubice 1. Miska 14 s raménkem 16 se pak otočí pákou 12 a odříznutý gel se tak odtransportuje mimo řezačku a plátek gelu se přenese ručně např. špachtlí do zkumavky nebo do scintilační lahvičky k měření. Stojan řezačky 11 je připevněn k vaně 24, která dává systému stabilitu a zabraňuje úniku případných stop radioaktivního materiálu.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

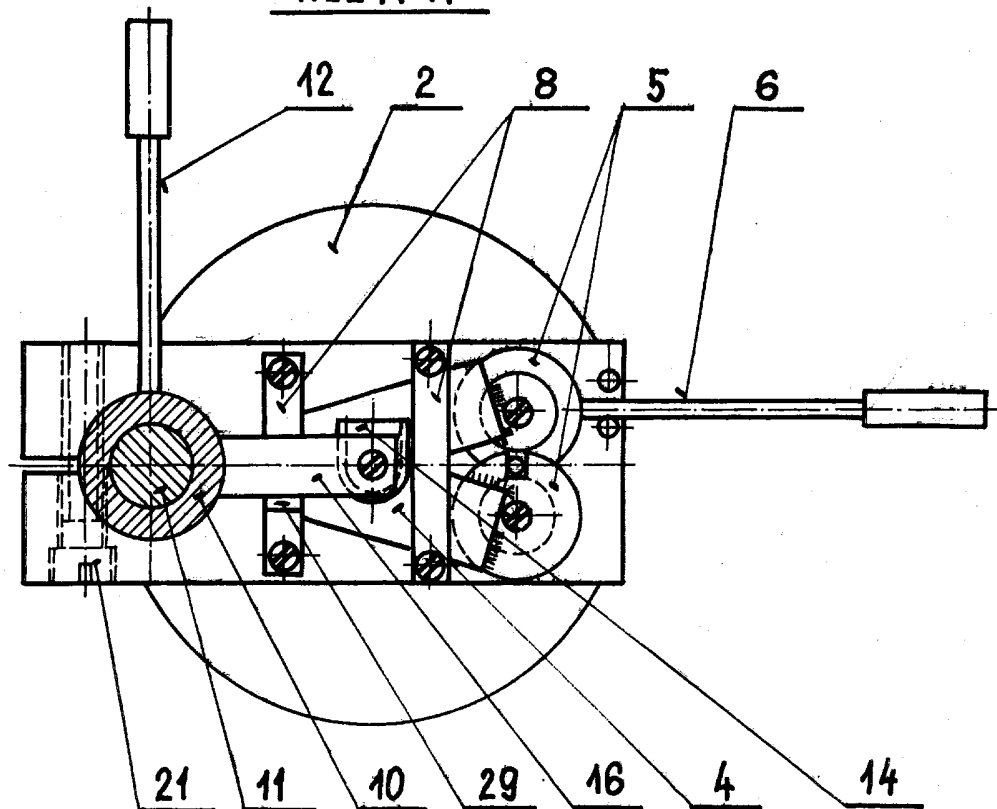
Příčná řezačka gelů pro diskovou elektroforézu, sestávající z vany, která současně tvoří podstavec řezačky a k níž je připevněn stojan s nosnou deskou s posuvným otočným pouzdem, které je ovládáno pákou a se šroubovým regulačním zařízením tloušťky řezu, význačná tím, že k nosné desce (20) je ve svislé poloze upevněna vodící trubice (1), na jejímž horním konci je nasazena ná-

dobka (2) a která uvnitř na spodním konci (28) je zúžena a dotýká se řezacích planžet (4), pod kterými se nachází miska (14) se zvýšeným okrajem, spojená raménkem (16) s posuvným a otočným pouzdem (10) a šroubovým regulačním zařízením (18) tloušťky řezu, přičemž řezací planžety (4) jsou pevně spojeny s unášecími kotouči (5), které jsou ovládány pákou (6).

3 výkresy



ŘEZ A-A



ŘEZ B-B

