



Patentdirektoratet
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 3499/84

(51) Int.Cl.6

G 01 N 27/26
B 01 D 57/02

(22) Indleveringsdag: 17 jul 1984

(24) Løbedag: 18 nov 1983

(41) Alm. tilgængelig: 17 jul 1984

(45) Patentets meddelelse bkg. den: 18 apr 1995

(86) International ansøgning nr.: PCT/US83/01826

(86) International indleveringsdag: 18 nov 1983

(85) Videreførelsesdag: 17 jul 1984

(30) Prioritet: 18 nov 1982 US 442580

(73) Patenthaver: THE *TRUSTEES OF COLUMBIA UNIVERSITY IN THE CITY OF NEW YORK; West 116th Street and Broadway; New York; NY 10027, US

(72) Opfinder: Charles R. *Cantor; US, David C. *Schwartz; US

(74) Fuldmægtig: Plougmann & Vingtoft A/S

(54) Fremgangsmåde og apparat til analytisk elektroforese under anvendelse af alternerende tværgående elektriske felter

(56) Fremdragne publikationer

US pat. nr. 4148703

(57) Sammendrag:

3499-84

Ved en elektroforetisk fremgangsmåde adskilles partikler ved hjælp af elektriske felter, som er tværgående i forhold til hinanden, som alternerer mellem henholdsvis høje og lave intensiteter ude af fase med hinanden ved en frekvens, som er forbundet med partiklernes masse, og som bevæger partiklerne i en generel retning, som er tværgående i forhold til felternes respektive retning. Til adskillelse af store makromolekyler har mindst ét af felterne fortrinsvis en intensitetsgradient i en retning, som er tværgående i forhold til dets egen retning. Ved fremgangsmåden er det muligt at 1) adskille partikler (molekyler), som er større end dem, der kan adskilles med hidtil kendte teknikker, 2) udføre adskillelse ved højere hastigheder og bedre opløsningsevne, end det er muligt med hidtil kendte teknikker, og 3) samtidig adskille partikler, som er meget forskellige i masse (molekylvægt).

3499-84

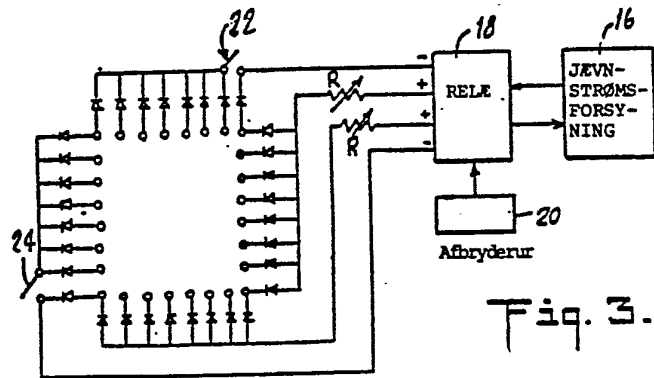


Fig. 3.

Opfindelsen angår en fremgangsmåde til adskillelse af partikler med en på forhånd bestemt omtrentlig masse, hvilken fremgangsmåde omfatter, at partiklerne i et gelmedium underkastes i det mindste to elektriske felter (E' , E''), som har generelt co-planare og i forhold til hinanden tværgående generelle feltretninger, og som alternerer mellem henholdsvis lave og høje intensiteter ude af fase med hinanden for at bevæge partiklerne i generelle retninger, som er generelt co-planare med, men tværgående i forhold til feltretningerne og opnår adskillelse af partiklerne og et apparat til fremgangsmåden, der omfatter en understøtning (10) for et gelmedium, i hvilket én eller flere prøver af partikler, som skal adskilles og har en på forhånd bestemt masse, kan anbringes, dele (14) til at generere i det mindste to felter, som indvirker på partiklerne og har co-planare generelle feltretninger, som er tværgående i forhold til hinanden, og dele (16, 18, 20) til repetitivt at alternere de respektive felter mellem henholdsvis lave og høje intensiteter ude af fase med hinanden for at bevæge partiklerne i generelle feltretninger for dermed at opnå adskillelse af partiklerne i et båndmønster.

Opfindelsen er gjort inden for det analytiske elektroforeseområde. Den har særlig interesse, hvad angår dens anvendelsesmuligheder inden for gensplejsning og molekylær biologi.

Opfindelsen, som er baseret på udviklingen af en ny slags analytisk elektroforese, gør det bl.a. muligt at udføre vigtige analyser, som ikke var mulige eller praktiske med de hidtil kendte teknikker. Mulige anvendelser omfatter adskillelse af chromosomalt DNA, chromosom-kortlægning, bekvem fremstilling af genbiblioteker, undersøgelser af virkningerne af forskellige aktivstoffer på chromosomalt DNA og bekvem karakterisering af polymerer. Opfindelsen gør det muligt at adskille større partikler (molekyler) med en høj grad af opløsning og med stor hastighed, end det er muligt at opspalte med de hidtil kendte teknikker, og samtidig adskille partikler, som er væsentligt forskellige i masse. I en foretrukken udførelsesform gør opfindelsen det muligt at lysere celler til elektroforetisk adskillelse af makromolekyler, som er indeholdt i cellerne, med minimal nedbrydning eller beskadigelse.

Elektroforese, hvor partikler såsom en blanding af makromolekyler bevæges, fx gennem en gelmatrix, ved hjælp af et elektrisk felt, er en udbredt teknik til kvalitativ analyse og adskillelse, isolering og rensning. Den er særlig vigtig i undersøgelsen af proteiner, nucle-
5 insyrer og chromosomer, jfr. fx Cantor, C.R. et al., *Biophysical Chemistry*, 2. del, Freeman, 1980, s. 676, 683. Den er sandsynligvis det vigtigste redskab, som anvendes i de fleste DNA- og chromosom-analyser.

Der opstår vanskeligheder, når det forsøges elektroforetisk at ad-
10 skille meget store partikler. Under anvendelse af de hidtil kendte teknikker er fx størrelsen af det største DNA-molekyle, som rutinemæssigt håndteres, et bakteriophagmolekyles ($3,2 \times 10^7$ daltons). En sådan begrænsning i størrelse forhindrer mange slags ønskelige analyser i at blive udført. Fx er intakt chromosomalt DNA større og redu-
15 ceres typisk i størrelse for at gøre det muligt at arbejde dermed. Derved ødelægges imidlertid vigtige oplysninger, som er indkodet i DNA'et, og mange vigtige forsøg udelukkes.

Det er blevet foreslået at udstrække gelelektroforesen til partikler med større masse ved at reducere gelkoncentrationerne. Dette har
20 imidlertid en negativ virkning på opløsningsevnen, gør forsøgsbetin- gelserne vanskelige at kontrollere og er ikke med held blevet anvendt på DNA-molekyler, som har en molekylvægt på over ca. 5×10^8 daltons. jfr. Fangman, W.L., *Nucleic Acids Research* 5 (3), marts 1978, s. 653-655; Serwer, P., et al., *Electrophoresis*, Walter, deGreuyter og Coe,
25 1981, s. 237-243.

I US patentskrift nr. 4.148.703 beskrives en elektroforeseindretning, hvori to krydsede ikke-uniforme elektriske felter med en tværgående gradient indvirker alternerende på enzymer og peptider i en polyacry-
30 lamidgel. Elektroforeseindretningen tilvejebringer en kontinuert strøms elektroforesefremgangsmåde, som er ejendommelig ved, at den præparation, der ønskes adskilt, indføres kontinuert i gelen ved en langsom men konstant strøm gennem et rør ind i et hulrum, der krydser gelen på det tykkeste sted, og ved at fraktionerne passerer gennem gelen i forskellige baner og flyder ud gennem forskellige huller
35 anbragt over gelens tykkelse, elueres ved hjælp af strømningsbuf-

feren, som løber under processen. I almindelighed er en sådan indretning beregnet til kontinuert strøms' adskillelse af proteiner, og når adskillelsen finder sted, forekommer den aktuelle elektroforese at tjene det formål at lede de allerede adskilte proteiner til særlige bortledningshuller.

Det formodes, at opløsningsevnen i de hidtil kendte elektroforeseteknikker er feltafhængige, da lavere elektriske feltintensiteter sædvanligvis giver højere opløsningsevne. Som følge heraf varer elektroforeseforsøg, hvor en højere opløsningsevne ønskes, ofte så lang tid som 100 timer. Endvidere formodes partikelmobiliteten og således opløsningsevnen at variere med logaritmen af massen af de partikler, som skal adskilles, hvilket naturligvis ikke er noget særligt følsomt grundlag til opnåelse af adskillelse. Endvidere anvendes der typisk i den hidtil kendte gelelektroforese forskellige gelkoncentrationer til forskellige masser eller molekylvægtområder, hvorved man begrænser spektret af partikler, som kan adskilles samtidig. Endvidere anvendes hidtil kendte elektroforeseteknikker typisk til kun at adskille små mængder partikler, og processen kan ikke hensigtsmæssigt udstrækkes til at omfatte større mængder.

På trods af, at elektroforese er blevet anvendt i længere tid og på trods af, at vigtige begrænsninger i teknikken og behovet for at overvinde dem også har været kendt længe, kendes der ikke nogen tidligere forslag, som med held har overvundet sådanne begrænsninger.

Den foreliggende opfindelse adskiller sig væsentligt fra de etablerede elektroforeseprincipper og er baseret på den overraskende erkendelse, at elektroforese gennem bevidst varierede elektriske felter, snarere end gennem de ensartede felter, som man har søgt i hidtil kendte elektroforesemetoder, uventet giver særdeles ønskelige resultater.

I ét aspekt angår opfindelsen således en analytisk elektroforesefremgangsmåde, som er ejendommelig ved, at den er i stand til at adskille i det mindste store DNA-molekyler, og at den frekvens, ved hvilket skiftet fra ét felt til et andet bør finde sted, er forbundet med en tid t , der er relateret til partiklens masse, som er molekylvægten M ,

i henhold til relationen $t \propto M^{1,5}$, og hvor tiden t er den tid, det tager for den partikel, der har interesse, at orientere sig i en i det væsentlige langstrakt cylindrisk form eller slangeform.

I et andet aspekt tilvejebringes et analytisk elektroforeseapparat til fremgangsmåden, hvilket apparat er ejendommeligt ved, at delene (16, 18, 20) til alternation af felterne er indrettede til at virke ved en frekvens, ved hvilket skiftet fra ét felt til et andet bør ske, som er relateret til en tid t , som er relateret til partiklens masse, som er molekylvægten M , i henhold til relationen $t \propto M^{1,5}$, og hvor tiden t er den tid, det tager den partikel, der har interesse, at orientere sig i en i det væsentlige langstrakt cylindrisk eller slangeform.

Nærmere betegnet er opfindelsen baseret på den erkendelse, at der opnås ønskelig adskillelse, når partiklerne udsættes for respektive elektriske felter, som bevæger dem som helhed i retninger, der generelt er co-planare med, men tværgående i forhold til de respektive generelle retninger af felterne. Særlig ønskelige resultater opnås i det mindste i de tilfælde, som hidtil er undersøgt, når mindst ét af de elektriske felter har en tilsigtet intensitetgradient i en retning, som er tværgående og generelt co-planar i forhold til dens egen. Som et specifikt ikke-begrænsende eksempel kan der anvendes to felter, som skifter mellem henholdsvis høje og lave intensiteter ude af fase med hinanden, og som er i retninger, som er tværgående i forhold til hinanden. Fx kan et af felterne være tilsluttet, medens det andet er afbrudt, etc. Der opnås særlig gode resultater, når felternes tilslutnings- og afbrydningstider er forbundet med massen af de partikler, som skal adskilles, fx når tilslutnings- og afbrydningsperioderne er proportionale med partiklernes masse opløftet til en potens på ca. 1,5.

En af de væsentlige fordele ved denne erkendelse er, at den dramatisk udstrækker masseområdet af partikler, som kan adskilles elektroforetisk med en høj opløsningsevne. Som et ikke-begrænsende eksempel kan den nye teknik med høj opløsningsevne adskille partikler, hvis masse er ca. $1,2 \times 10^9$ daltons, medens den øvre grænse af de hidtil kendte metoder, som giver en lavere opløsningsevne, formodes at være ca.

0,5 x 10⁹ daltons. Det antages, at den nye teknik også kan adskille partikler, som er større end 1,2 x 10⁹ daltons. En anden væsentlig fordel er, at opløsningsevnen i den nye teknik er meget mindre afhængig af elektrisk feltdensitet; som følge heraf kan den nye type elektroforese udføres ved en langt større hastighed, så længe den dannede varme effektivt kan spredes. Som følge heraf kan et typisk laboratorieforsøg udføres på 4-8 timer, hvorimod tilsvarende forsøg under anvendelse af hidtil kendte teknikker kræver 12-100 timer. En anden væsentlig fordel ved den nye teknik er, at der kan anvendes større mængder af prøven sammenlignet med den kendte teknik, hvilket medfører forøget opløsningsevne og følsomhed. En yderligere fordel er, at den nye teknik samtidig i samme gel kan adskille partikler fra et bredere masseområde, end det formodes at være muligt med hidtil kendte teknikker. Som et ikke-begrænsende eksempel kan den nye teknik samtidig i samme gel adskille partikler i et masseområde på fra ca. 10⁶ til ca. 10⁹ daltons. Med de hidtil kendte teknikker ville flere forskellige gelkoncentrationer have været nødvendige for at adskille partikler i det snævrere masseområde fra ca. 10⁶ til ca. 10⁸ daltons. I et yderligere vigtigt aspekt af opfindelsen er der udviklet en teknik til at minimere håndteringsskader på makromolekyler, som stammer fra celler, ved at lysere celler eller spheroplaster i en gelblok, som er den samme som eller kompatibel med elektroforesegelelen, og anbringe hele blokken i elektroforesekammeret.

Disse og andre fordele ved opfindelsen samt yderligere opfinderiske karakteristika fremgår af nedenstående detaljerede beskrivelse.

Opfindelsen forklares nærmere under henvisning til tegningen, hvor fig. 1 i perspektiv og delvis afskåret viser et elektroforesekammer, som er anvendeligt til at forklare visse principper i opfindelsen, fig. 2 viser fra oven det samme kammer, fig. 3 er et delvis skematisk diagram og delvis blokdiagram, der viser en indbyrdes forbindelse med eksempler på kammerelektroder, fig. 4-7 viser eksempler på elektriske felter, som virker i elektroforesekammeret, fig. 8 viser bevægelsen af partikler i den nye type elektroforese, fig. 9 viser en hypotetisk forvridning og bevægelse af et stort DNA-

- molekyle gennem agarosegel under indflydelse af tværgående elektriske felter, som virker ude af fase,
- fig. 10 viser den hypotetiske virkning af et ensartet elektrisk felt på et stort DNA-molekyle i agarosegelen,
- 5 fig. 11 svarer til fig. 10, men viser den hypotetiske virkning af et elektrisk felt, som har en væsentlig intensitetsgradient i en retning, som er tværgående i forhold til feltretningen,
- fig. 12 viser cirkulationen af afkølet puffer gennem elektroforesekammeret,
- 10 fig. 13 viser den opnåede opløsningsevne i et eksperimentelt eksempel under anvendelse af den nye slags elektroforese,
- fig. 14 viser i perspektiv en støbeform, som anvendes til at lysere celler eller spheroplaster *in situ* i gelblokke, som derefter indsættes i modsvarende brønde i elektroforesegelen.
- 15 Et eksempel på en laboratorieindretning, som er nyttig til at forklare visse principper i opfindelsen, er i perspektiv og delvis afskåret vist i fig. 1 og i fig. 2 fra oven. Den omfatter et rektangulært elektroforesekammer 10, som er åbent for oven, og som er fremstillet af et elektrisk isolerende materiale såsom 6,4 mm plexi-
- 20 glas med dimensioner på ca. 10,2 x 10,2 cm. Det understøtter på bunden et lag af materialemedium 12 såsom den agarosegel, som er almindeligt anvendt i elektroforese, omgivet af elektroder 14. Elektroderne er tynde (0,8 mm) platintråde, som strækker sig lodret ca. 19,1 mm hver og er anbragt i en indbyrdes afstand på ca. 1,5 cm, som
- 25 det ses ovenfra i fig. 2.

Som et eksempel kan elektrodetrådene føres ind i kammeret gennem respektive huller, som er anbragt i en horisontal række ca. 19,1 mm over kammerets indre bund, idet hver tråd strækker sig nedefter langs en respektiv indre sidevæg til kammerets indre bund. For at generere

30 de ønskede elektriske felter er elektroderne 14 indbyrdes forbundne som vist i fig. 3. Især tilfører en jævnstrømsforsyning 16 (såsom Biorad Model 500) jævnstrøm til et relæ 18 (såsom et DPDT, 115 volts vekselstrømsrelæ), der styres af et programmerbart afbryderur 20 (såsom et Lindberg Enterprises Chronrol 4-Channel CT Series) for at

35 forbinde et udvalgt outputpar af dets to outputpar med jævnstrømmen fra forsyningen 16. Et outputpar i relæet 18 (bestående af en negativ

og positiv outputterminal) er forbundet til top- og bundrækkerne af elektroder 14 (jfr. fig. 3) via en respektiv diode for hver elektrode. Imidlertid er alle elektroderne i toprækken kun forbundet til den negative outputterminal i relæet 18, når en kontakt 22 er lukket; når kontakten 22 er åben, er kun den elektrode 14, som er yderst til højre, således forbundet. Det andet par af relæet 18's outputterminaler er tilsvarende forbundet til den venstre og højre række af elektroder 14 under anvendelse af en tilsvarende kontakt 24 til samme formål. Der kan anvendes variable modstande R til at variere de relevante spændinger, hvilket også er tilfældet med kontrollerne i strømforsyningen 16. Kontrollerne i afbryderuret 20 bestemmer, hvornår der sendes strøm igennem et bestemt par af relæet 18's terminaler, og hvornår der ikke sendes strøm igennem.

Når kontakten 22 er slukket, og de relæoutput, som sender strøm gennem top- og bundrækkerne af elektroder 14, er tilsluttet, fx ved henholdsvis +200 og -200 volt, etableres et i det væsentlige ensartet elektrisk felt E hen over bunden af elektroforesekammeret som vist skematisk i fig. 4. De korte pile i fig. 4 er ensartede i længden for at vise, at feltet er i det væsentlige ensartet, og den længere pil viser feltets generelle retning (fra de positive til de negative elektroder). Selv om feltet i realiteten ikke er fuldstændig ensartet i intensitet gennem hele gelen på grund af det fysiske arrangement af de enkelte med indbyrdes afstand anbragte elektroder og af andre årsager, og selv om den generelle retning kan afvige noget fra lodret (som vist i fig. 4), betegnes sådanne felter i nærværende beskrivelse som ensartede og skelnes fra felter, som bevidst gøres uensartede, fx ved at forårsage en operativt signifikant intensitetsgradient i en retning, som er tværgående i forhold til den generelle feltretning.

Et felt E1, som er uensartet ved, at det har en operativt signifikant intensitetsgradient i en retning, som er tværgående i forhold til den generelle feltretning, er vist i fig. 5 og fås i dette eksempel ved at åbne kontakt 22 således, at kun elektroden i det øverste højre hjørne på fig. 5 beholder +200 volt potentialet, medens hver af bundelektroderne har et -200 volts potentiale. Det elektriske felt, som er vist i fig. 5, er i nogen grad vifteformet, men har stadig en generel retning, som er vist med den længere pil, som kan anskues som

vektorsummen af de enkelte felter, der skyldes de respektive potenti-
alforskelle mellem elektroden i øverste højre hjørne og de enkelte
elektroder på nederste række. Den interessante intensitetsgradient er
i en retning, som er tværgående i forhold til den generelle feltret-
ning, vist med en pil G, og skyldes, at afstanden mellem elektroden i
5 øverste højre hjørne og elektroderne på nederste række forøges (og
intensiteten pr. enhedsvolumen eller enhedsareal af de enkelte felter
således mindskes), efterhånden som man bevæger sig mod venstre i den
nederste række, hvilket er vist ved den stadig mindre længde af de
10 kortere pile.

Når kontakten 24 er åben, og der sendes strøm igennem de relæoutput,
som er forbundet til elektroden i nederste venstre hjørne og elektro-
derne i rækken til højre, genereres på tilsvarende måde et felt E2
som vist i fig. 6. Den eneste betydelige forskel mellem felterne i
15 fig. 5 og fig. 6 er, at feltet i fig. 6 har en anden generel retning,
som er tværgående i forhold til retningen af felt E1 i fig. 5.

Én af de uventede erkendelser, som udnyttes i den foreliggende op-
findelse, er, at hvis felter såsom E1 og E2 alternerer ude af fase
med hinanden mellem respektive høje og lave intensiteter ved frekven-
20 ser, som er valgt på basis af massen af partiklerne (fx makromoleky-
ler), som skal adskilles elektroforetisk, bevæger partiklerne sig fra
en initial position såsom ved 26 i en generel retning D, som er
tværgående i forhold til både felt E1 og E2, og for enhver partikel
gælder, at dens bevægelsehastighed afhænger af dens masse (eller
25 ladning). Som følge heraf vandrer partikler med forskellig masse
(ladninger) forskellige afstande fra initialpositionen 26 og danner
bånd såsom M1, M2, M3 og M4 i fig. 8, idet lettere partikler bevæger
sig over længere afstande fra initialpositionen.

Det skal bemærkes, at udtrykket "tværgående" i nærværende beskrivelse
30 ikke er begrænset til en vinkel på eller nær 90° , men omfatter andre
betydelige skæringsvinkler. Når udtrykket anvendes for vinklen mellem
elektriske felter såsom E1 og E2, skal det blot udelukke de vinkler
mellem elektriske felter, som i den kendte teknik er et resultat af
falske fænomener eller manglende evne til i praksis at nå det plan-
35 lagte mål med en ensartet og ensrettet kombination af felter. Når

udtrykket "tværgående" anvendes om vinklen mellem den generelle retning af partikelbevægelse, skal udtrykket også i dette tilfælde kun udelukke vinkler, som er et resultat af falske fænomener eller en manglende evne hos kendte indretninger til at få den elektroforetiske bevægelse til at falde sammen med den ønskede feltretning.

Udtrykket "operationelt signifikant" betegner en intensitetsgradient, som er tilstrækkelig til at gøre de relevante felter i stand til at bevæge de relevante partikler i den retning, som er tværgående i forhold til de generelle feltretninger, som fx vist i fig. 7.

Der kan i visse tilfælde opnås tilfredsstillende resultater med elektriske felter, som alternerer og er tværgående i forhold til hinanden som ovenfor beskrevet, men som er i det væsentlige ensartede, hvilket er tilfældet med felt E i fig. 4. Der opnås imidlertid typisk bedre resultater, når ét af felterne har den nødvendige intensitetsgradient i den retning, som er tværgående i forhold til dets generelle retning. Der opnås typisk bedre resultater, når begge felter har sådanne intensitetsgradienter.

Selv om den mekanisme, hvorved den nye type elektroforese virker, ikke er fuldstændigt opklaret, formodes det, at anvendelsen af alternerende felter får en stor partikel såsom et spiralrullet DNA-molekyle til at blive presset ind i agarosematrixen ved, at det orienteres først langs den generelle retning af ét felt og derefter langs den generelle retning af det andet, etc. Det formodes endvidere, at anvendelsen af gradientfelter (såsom E_1 og E_2) snarere end ensartede felter (såsom E) forårsager en forskydningseffekt, som er medvirkende til at strække molekylet i den ønskede retning. Fig. 9 viser denne hypotese ved at vise et tilfældigt spiralrullet DNA-molekyle, som presses ind i en agarosegelmatrix ved hjælp af et ensartet elektrisk felt E' og presses ind i gelen ved at blive formet til en langstrakt cylindrisk form (slange). Denne slange udsættes derefter for et ensartet elektrisk felt E'' og fordrejes derefter gradvist bort fra den indledende slangeform, til den danner en ny slange, som nu er orienteret langs den generelle retning af felt E'' , etc., således at dens generelle bevægelsesretning er langs den tilnærmelsesvis vektorsum af retningen af felterne E' og E'' . Denne indledende hypotese

er imidlertid blevet modificeret af en senere formodning om, at makromolekyler med stor kædelængde såsom DNA sandsynligvis ikke danner en slange, når deres vendingsradius er større end den effektive gelporeradius. I stedet presses sådanne makromolekyler forment-

5 lig sammen til en form, som mere ligner en "øldåse" end en slange som vist i fig. 10, og de bevæger sig derfor ikke let i en retning, som er tværgående i forhold til "øldåsens" længdeakse. Det formodes i realiteten, at anvendelsen af en gradient snarere end et ensartet felt er en af de kritiske faktorer til at tvinge store molekyler

10 såsom DNA-molekyler til at antage den ønskede forlængede cylindriske form eller slangeform som vist i fig. 11. Det formodes endvidere, at det korrekte valg af en frekvens, ved hvilken skiftet fra ét felt til et andet bør finde sted, er forbundet med den tid, det tager partiklen (molekylet), der har interesse, at orientere sig i den ønskede

15 langstrakte cylindriske form eller slangeform, og at denne tid t er relateret til partiklens masse (molekylvægt) M , gelens effektive poreradius r og den målte hastighed af partiklen i gelen v i henhold til forholdet $t \propto M^{1,5}/(r^2v)$.

Det skal understreges, at den ovenfor beskrevne hypotese ikke skal

20 opfattes som en faktor, som begrænser opfindelsens omfang, selv om den stemmer overens med de hidtil opnåede forsøgsresultater, da opfindelsen frembringer de gunstige resultater på trods af, at det underliggende fænomen ikke fuldt ud er forstået og på trods af muligheden for, at en helt anden mekanisme kan være involveret.

25 Opfindelsen belyses nærmere ved nedenstående eksempler:

Generelle elektroforesebetingelser i eksempel A, B og C.

Geler med en tykkelse på ca. 1 cm blev støbt i kvadratiske engangs Petri-skåle med et areal på 10 cm². Brønde til prøven blev dannet på

30 sædvanlig måde under anvendelse af en plastkam med tænder med dimensioner på 6,35 x 2 mm anbragt med en indbyrdes afstand af 3,175 mm. Gelerne bestod af 1,5% lav endosmose-agarose (Miles Biochemical Company) opløst i TBE (10,3 g Tris, 5,5 g borsyre og 0,93 g dinatrium-EDTA pr. liter). Elektroforesepufferen (TBE) blev kontinuerligt cirkuleret ved hjælp af en magnetisk drevet i et polypropylen-

hus anbragt skovlpumpe (Fischer Scientific) og afkølet i et recirkulerende afkølet bad (Haake, type T-52) som vist i fig. 12. Tilførsels- og udløbsenderne af cirkulationsledningerne var anbragt tæt på gelen og tilførte og bortledte flydende puffer ved to diametralt mod-

5 satte hjørner af gelkvadraten. Prøver blev anbragt i brøndene ved hjælp af en Gilson Pipetman, idet pipettespidsens ender var afskåret for at minimere forskydning. DNA blev visualiseret efter gennemvædning af gelerne i 0,5 μg ethidiumbromid pr. ml TBE. Der blev taget fotografier med Polaroid® 107 film med kortbølget U.V.-lys. Eksponeringstiden varierede fra 15 til 180 sekunder ved f8 afhængig af

10 prøverne.

EKSEMPEL A

Fremstilling og elektroforese af markør-DNA

Bacteriophagvira T7, T2 og G blev fremstillet ved at lysere en given

15 mængde virus natten over ved 50°C i NDS som beskrevet i Laurer et al., *Journal of Microbiology* 95, 1975, s. 309-326. De resulterende lysater blev derefter dialyseret natten over mod elektroforesepufferen. Bacteriophag DNA'ets masse i daltons antages at være:

T7=2,7 x 10⁷; T2=1,2 x 10⁸ og G=5 x 10⁸. En 0,02 μg 's prøve af hvert

20 DNA blev anbragt i brønde i 5 mikroliter 10%'s glycerol, TBE og 0,0015% bromphenolblåt. Prøverne blev kørt ind i gelen med et enkelt felt i 15 minutter før pulsering. Optimale impulstider i sekunder til adskillelse af makromolekyler nær eller ved den i nedenstående eksempler anførte molekylvægt var T7=0,25; T2=4 og G=20. Udtrykket

25 "impulstid" betegner impulsbredde, dvs. det tidsinterval, i hvilket ét af felterne er tilsluttet (eller højt), medens det andet er afbrudt (eller lavt). I dette forsøg anvendtes felter af den type og i det spændingsniveau, som er vist i fig. 5 og 6, dvs. begge felter havde intensitetsgradienter. Den relative mobilitet, som blev opnået

30 i dette forsøg, var G=1; T2=2,5 og T7=8.

EKSEMPEL B

Gær-DNA

Forskellige gærstammer blev dyrket til midt i den logaritmiske vækst-
fase i 100-1000 ml YPD (YPD: 1 g gærekstrakt, 2 g dextrose og 2 g
5 bactopecton sat til 1 liter destilleret vand). Spheroplaster blev
fremstillet som beskrevet i Cryer et al., *Progress in Cell Biology*
12, 1975, s. 39-44. Spheroplasterne blev derefter lyseret i NDS
natten over ved 50°C. Gærlysater blev fremstillet i NDS med koncen-
trationer i området ca. 10^9 - 2×10^{10} celler pr. ml lysat. Generelt
10 blev der anbragt 90 mikroliter lysat under anvendelse af en Pipetman
med blå spids (1 ml's kapacitet). Prøverne blev kørt ind i en 1,5%'s
agarosegel ved 100 volt i 45 minutter med et enkelt felt. Impulstider
på 15-45 sekunder ved 200 volt (felt E1 og E2 i fig. 5 og 6) gav de
molekylvægtadskillelser, som er vist i lille målestok i fig. 13.

15 EKSEMPEL C

Ethidiumbromid

Der anvendtes de i eksempel B beskrevne forsøgsbetingelser med und-
tagelse af, at gelerne blev kørt i mørke og indeholdt 0,5 μ g pr. ml
ethidiumbromid i gelen sammen med cirkulationspufferen, og impuls-
20 tiderne var 30 og 45 sekunder under anvendelse af D-273-gærlysater.
Der blev opnået klar adskillelse af mange chromosomer.

I ovennævnte eksempler foretoges lysen på sædvanlig måde, og lysa-
terne blev overført til elektroforesegelen på sædvanlig måde. Det er
kendt, at en sådan håndtering af lysaterne kan medføre brud på eller
25 anden beskadigelse af skrøbelige makromolekyler. Der er imidlertid
fundet en udvej til i det væsentlige at undgå sådanne skadelige
virkninger, og denne udgør en del af opfindelsen. Især kan celler
eller spheroplaster (celler uden cellevægge) ifølge opfindelsen sus-
penderes i agarosegel, og denne gel kan hældes i forme til dannelse
30 af indsætninger. Indsætningerne anbringes derefter i lyseopløsning
for at lysere de suspenderede celler eller spheroplaster, og derefter

kan de intakte indsætninger anbringes tætsluttende i modsvarende brønde i elektroforesegelen. Gelen, som udgør indsætningerne, kan være den samme som eller konvertibel med elektroforesegelen.

Et eksempel på en form, som anvendes i denne nye teknik, er vist i
 5 perspektiv i fig. 14 og udgør et par modsvarende rektangulære blokke
 14a og 14b, som kan fastgøres i den viste konfiguration ved hjælp af
 skruer 14c. Den øverste blok 14a har et antal formningskanaler 14d,
 som går gennem hele blokkens tykkelse, hvorimod den underste blok 14b
 er i ét stykke. Når blokkene er samlet i den i fig. 14 viste kon-
 10 figuration, hældes en hensigtsmæssig agarosegel med suspenderede
 celler eller spheroplaster i formningskanalerne 14d og lades størkne.
 Blokkene 14a og 14b skilles derefter, og indsætningsblokkene såsom
 14e tages forsigtigt ud, anbringes i lyseringsmateriale under betin-
 gelser, som er tilstrækkelige til at opnå tilfredsstillende lyse, og
 15 indsættes derefter forsigtigt og tætsluttende i modsvarende brønde,
 som er formet i elektroforesegelen, fx med en kam, hvis ydre form og
 dimensioner svarer til formningskanalerne 14d. Det nedenstående ek-
 sempel D viser elektroforese under anvendelse af den nye teknik.

EKSEMPEL D

20 Lyse i gelindsatser

Gærspheroplaster (10^{10} - 10^{11} celler pr. ml af 1%'s lavt gelerende
 agarose i TBE) blev suspenderet i agarosegel og hældt i formkanalerne
 til dannelse af indsætninger. Indsætningerne blev derefter anbragt i
 NDC ved 50°C natten over, hvorved de suspenderede spheroplaster blev
 25 lyseret. Gærceller, som forinden var behandlet med mercaptoethanol,
 blev også suspenderet i 1%'s agarosegel, men i dette tilfælde til-
 sattes 75 mikroliter af en Zymolyase 5000 blanding (2 mg pr. ml 0,01M
 natriumphosphat, 50% glycerol) til indsætningsblandingen før form-
 ningen af indsætningerne. 75 mikroliter Zymolyase sattes også til 0,8
 30 ml LET (0,5M tetranatrium-EDTA, 0,01M Tris, pH-værdi 7,5). De formede
 indsætninger med gærcellerne sattes til LET og blev inkuberet natten
 over ved 37°C. De resulterende suspenderede spheroplaster blev der-
 efter lyseret i NDS. Både celle og spheroplastindsatser blev anbragt

i modsvarende brønde i elektroforesegelen. Elektroforese under de i eksempel A-C beskrevne betingelser gav en god adskillelse af chromosomalt DNA.

EKSEMPEL E

5 Dobbelt mini-DNA

2,5 x 10⁷ 3T3-R500 museceller blev lyseret i 0,3 ml NDS ved 50°C i fire (4) dage. Lysatet blev derefter anbragt på 1,5%'s agarosegel i TBE og kørt ved 200 volt med 60 sekunders impulser. Herved vandtes et diffust bånd. Det bevægede sig, som om det havde molekylvægten af intakt dobbelt mini-DNA (molekylvægt ca. 600 x 10⁶). Markøren var G-phagen (molekylvægt ca. 500 x 10⁶).

Den nye slags elektroforese, som er beskrevet ovenfor, har adskillige anvendelser. Fx er chromosomalt DNA fra gær ved denne teknik for første gang med held blevet adskilt og karakteriseret i størrelser.

15 En anden anvendelse af den nye teknik er undersøgelse af karakteren af DNA-gyrasecomplexer i *E. coli* supercoilede, chromosomale områder for at kortlægge gyrasesteder og således tilvejebringe redskaber til eucaryot chromosomanalyse. Den nye teknik er særlig fordelagtig, når forskellige molekyler såsom forskellige DNA-molekyler er tæt på hinanden i masse. Anvendelsen af alternerende felter, som hver er forsynet med en intensitetsgradient, har en tendens til at forbedre opløsningsevnen dramatisk og tillade uventet adskillelse af molekyler, som er tæt på hinanden i masse. En anden anvendelse er adskillelse af et stort antal bånd i samme gel, hvilket er en væsentlig

20 betragtning, når eucaryot DNA analyseres. En yderligere anvendelse af den nye slags elektroforese er at rense molekyler såsom enzymer, fx urokinase, myosiner eller hyaluronsyrer, således at der tilvejebringes en oprenset prøve, som kan tjene som grundlag til udvikling af en måde til at fremstille det samme eller et ækvivalent molekyle. I en

30 anden anvendelse kan virkningen af forskellige midler såsom lægemidler bedømmes for deres virkning på chromosomer, nucleinsyrer og proteiner som følge af den mulighed for at adskille sådanne materialer, som er tilvejebragt ved den foreliggende opfindelse. Som et

yderligere eksempel kan polymerer nøjagtigt og hurtigt analyseres for molekylvægtsfordeling, forgreninger og andre fysiske egenskaber ved anvendelse af den nye type elektroforese. Som et yderligere eksempel kan intakte eller spaltede menneske-, dyre- eller plantechromosomer
5 analyseres under anvendelse af den nye type elektroforese.

Det er klart, at den i fig. 1-8 viste laboratorieindretning og de særlige typer elektriske felter, som anvendes deri, og den i fig. 14 viste indsætningsformningsindretning blot er specifikke eksempler, som er hensigtsmæssige til forklaring af visse af opfindelsen prin-
10 cipper. Talrige variationer er mulige og er omfattet af opfindelsen. Fx kan der anvendes et anderledes formet elektroforesekammer eller anderledes genererede, fordelte eller varierede elektriske felter, så længe partiklerne påvirkes af elektriske felter, som varierer med tiden, således at de hovedsageligt bevæges i retninger, som generelt
15 er tværgående i forhold til i det mindste to af de relevante, operationelt signifikante felter. Fx kan de ønskede felter genereres af anderledes formede elektroder, af hensigtsmæssigt aktiverede spiraler eller andre kilder eller kombinationer af forskellige (i type) kilder, og de relevante feltretninger kan reguleres på anden måde såsom
20 uden begrænsninger at ændre feltets samlede retning eller forandre elektrodeegenskaberne (fx potentialet). Tilsvarende kan den ønskede feltgradient frembringes på en hvilken som helst måde såsom ved udvælgelse af en hensigtsmæssig form af de relevante elektroder, ved at holde forskellige elektrodedele ved forskellige potentialer eller
25 ved samvirken mellem to eller flere felter. Endvidere kan der anvendes mere end to felter, så længe den samlede virkning er i det mindste at indvirke på en partikel på den ønskede måde i først én retning og derefter i en anden retning, som er tværgående i forhold til den første, etc., således at partiklen bevæges i en tredje ret-
30 ning, som er tværgående i forhold til de første to retninger.

I den ovenfor beskrevne foretrukne udførelsesform for den nye elektroforeseindretning har det vist sig ønskeligt at have flere adskilte elektroder og forbinde dem via indretninger (såsom dioder), som alene tillader strømforsyning til hver elektrode i en udvalgt retning. Det
35 har endvidere vist sig ønskeligt, at trådelektroderne strækker sig i det væsentlige lodret langs de indre sidevægge af kammeret, fordi

sådanne elektroder gør det særlig bekvemt at generere de ønskede elektriske felter, og fordi det er muligt med sådanne elektroder, når de er lange nok i den lodrette retning, at anbringe flere gellag oven på hinanden, der hver især indeholder prøver af partikler, og udsætte dem alle for i det væsentlige identiske elektriske felter, således at elektroforese udføres samtidigt i dem alle. Til generering af mere komplekse felter eller til at give større valgfrihed i frembringelsen af felter med udvalgte egenskaber såsom felterne E, E1 og E2 i fig. 4-6, kan hver elektrode (eller i det mindste en elektrode i flere udvalgte elektroder) have sin egen afbrydelige strømfor-
syningsforbindelse, således at hver især selektivt kan holdes ved et hvilket som helst positivt eller negativt elektrisk potential inden for et udvalgt område (eller ved jordpotential). I nogle tilfælde er så få som tre elektroder tilstrækkeligt, og to af dem kan være forbundet (intermitterende) til det samme potential, så længe de samvirker med hinanden til frembringelse af i det mindste to elektriske felter, som har de ønskede egenskaber (dvs. er tværgående i forhold til hinanden).

I én variant kan den nye type elektroforesearrangement, som er beskrevet ovenfor, anvende højfrekvent omskiftning mellem tværgående felter, fx med frekvenser i området fra ca. 10^6 til ca. 10^9 Hz, som er overlejet på ét eller flere stationære felter eller mere langsomt omskiftende felter såsom de ovenfor beskrevne felter E, E1 og E2. Det formodes, at det eller de hurtigt omskiftende felter kan hjælpe med til at rotere (eller orientere) partikler såsom makromolekyler på en ønsket måde, medens det eller de stationære eller langsomt omskiftende felter kan tjene til at bevæge partiklerne i den ønskede generelle retning. Dette arrangement af hurtigt omskiftende felter og stationære eller langsomt omskiftende felter kan faktisk anvende så få som to tværgående felter, hvoraf i det mindste det ene har en stationær eller langsomt omskiftende intensitetskomponent og en hurtigt omskiftende intensitetskomponent, som er overlejet derpå. Fx kan der anvendes gensidigt tværgående felter E1 og E2 som vist i fig. 7, men for i det mindste den ene af elektroderne kan der på den viste firkantssvingnings-spændingsbølgeform være overlejet en meget mere højfrekvent spændingsbølgeform med en udvalgt amplitude såsom en frekvens på fra ca. 10^6 til ca. 10^9 Hz.

PATENTKRAV

1. Analytisk elektroforesefremgangsmåde til adskillelse af partikler med en på forhånd bestemt omtrentlig masse, hvilken fremgangsmåde omfatter, at partiklerne i et gelmedium underkastes i det mindste to elektriske felter (E' , E''), som har generelt co-planare og i forhold til hinanden tværgående generelle feltretninger, og som alternerer mellem henholdsvis lave og høje intensiteter ude af fase med hinanden for at bevæge partiklerne i generelle retninger, som er generelt co-planare med, men tværgående i forhold til feltretningerne og opnår adskillelse af partiklerne
- 10 k e n d e t e g n e t ved, at den er i stand til at adskille i det mindste store DNA-molekyler, og at den frekvens, ved hvilket skiftet fra ét felt til et andet bør finde sted, er forbundet med en tid t , der er relateret til partiklens masse, som er molekylvægten M , i henhold til relationen
- 15 $t \propto M^{1,5}$, og hvor tiden t er den tid, det tager for den partikel, der har interesse, at orientere sig i en i det væsentlige langstrakt cylindrisk form eller slangeform.
2. Fremgangsmåde ifølge krav 1,
- 20 k e n d e t e g n e t ved, at mindst ét af felterne har en intensitetsgradient i en retning, som er tværgående og generelt co-planar i forhold til dets generelle retning i det mindste i en del af den tid, hvori det indvirker på partiklerne.
3. Fremgangsmåde ifølge krav 1,
- 25 k e n d e t e g n e t ved, at partiklerne er polypeptidmolekyler.
4. Fremgangsmåde ifølge krav 1,
- k e n d e t e g n e t ved, at partiklerne er myosin- eller hyaluronsyremolekyler.
5. Fremgangsmåde ifølge krav 1,
- 30 k e n d e t e g n e t ved, at partiklerne er nucleinsyremolekyler.

6. Fremgangsmåde ifølge krav 5,
k e n d e t e g n e t ved, at nucleinsyremolekylerne er DNA-mole-
kyler.
7. Fremgangsmåde ifølge krav 1,
5 k e n d e t e g n e t ved, at partiklerne er chromosomer.
8. Fremgangsmåde ifølge krav 7,
k e n d e t e g n e t ved, at chromosomerne stammer fra en eucaryot.
9. Fremgangsmåde ifølge krav 1,
k e n d e t e g n e t ved, at partiklerne er menneskechromosomer.
- 10 10. Fremgangsmåde ifølge krav 1,
k e n d e t e g n e t ved, at partiklerne er dyrechromosomer.
11. Fremgangsmåde ifølge krav 1,
k e n d e t e g n e t ved, at partiklerne er plantechromosomer.
12. Fremgangsmåde ifølge krav 1,
15 k e n d e t e g n e t ved, at partiklerne er gærchromosomer.
13. Fremgangsmåde ifølge krav 1,
k e n d e t e g n e t ved, at de partikler, der adskilles, fås ved
at lysere hele celler eller spheroplaster i en indsats af den samme
eller en kompatibel gel, som derefter anbringes i gelmediet, og hvori
20 den elektroforetiske adskillelse udføres uden først at adskille
partiklerne fra de lyserede hele celler eller spheroplaster.
14. Analytisk elektroforeseapparat, der omfatter en understøtning
(10) for et gelmedium, i hvilket én eller flere prøver af partikler,
som skal adskilles og har en på forhånd bestemt masse, kan anbringes,
25 dele (14) til at generere i det mindste to felter, som indvirker på
partiklerne og har co-planare generelle feltretninger, som er tvær-
gående i forhold til hinanden, og dele (16, 18, 20) til repetitivt at
alternere de respektive felter mellem henholdsvis lave og høje inten-
siteter ude af fase med hinanden for at bevæge partiklerne i generel-

le feltretninger for dermed at opnå adskillelse af partiklerne i et båndmønster,

k e n d e t e g n e t ved, at delene (16, 18, 20) til alternering af felterne er indrettede til at virke ved en frekvens, ved hvilket 5 skiftet fra ét felt til et andet bør ske, som er relateret til en tid t , som er relateret til partiklens masse, som er molekylvægten M , i henhold til relationen $t \propto M^{1,5}$, og hvor tiden t er den tid, det tager den partikel, der har interesse, at orientere sig i en i det væsentlige langstrakt cylindrisk eller slangeform.

10 15. Elektroforeseapparat ifølge krav 14,

k e n d e t e g n e t ved, at de feltgenererende dele (14) omfatter mindst tre adskilte elektroder, som er anbragt med en indbyrdes afstand, og dele (18, 20, 22) til at holde de respektive elektroder ved respektive udvalgte potentialer i respektive udvalgte tidsrum.

Fig. 1.

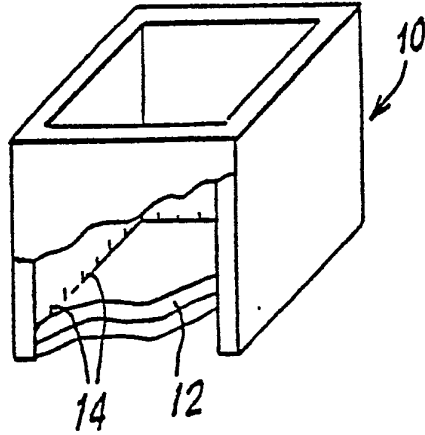


Fig. 2.

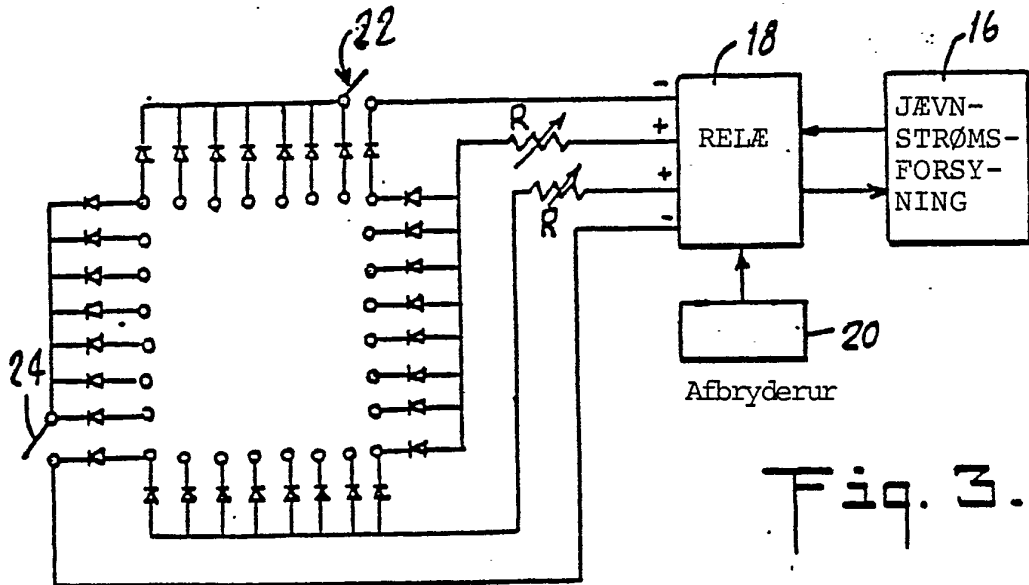
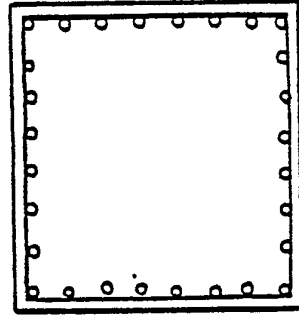


Fig. 3.

Fig. 4.

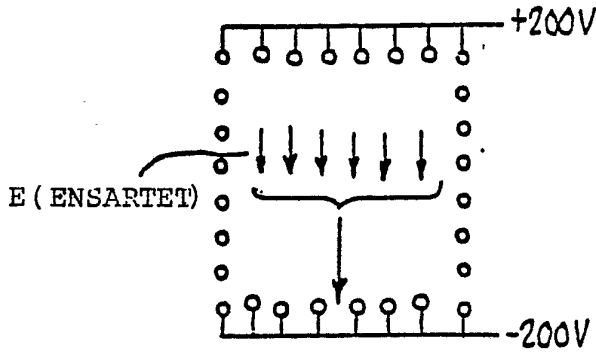


Fig. 5.

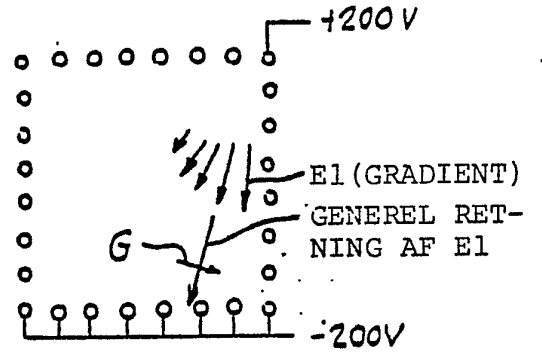


Fig. 6.

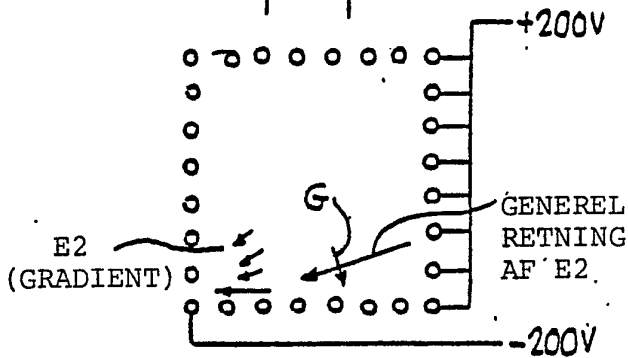


Fig. 7.

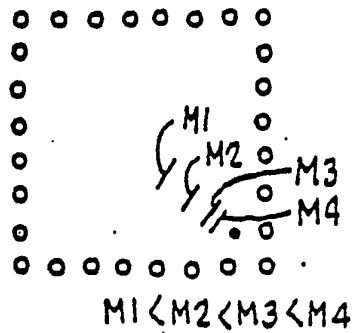
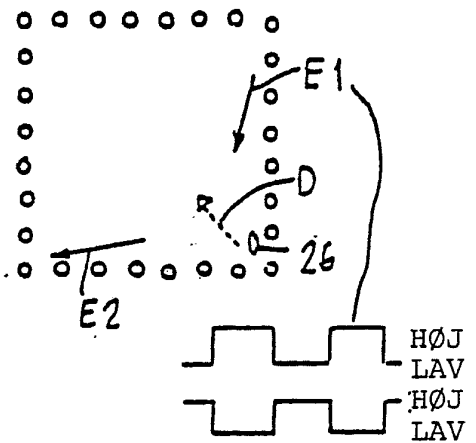


Fig. 8.

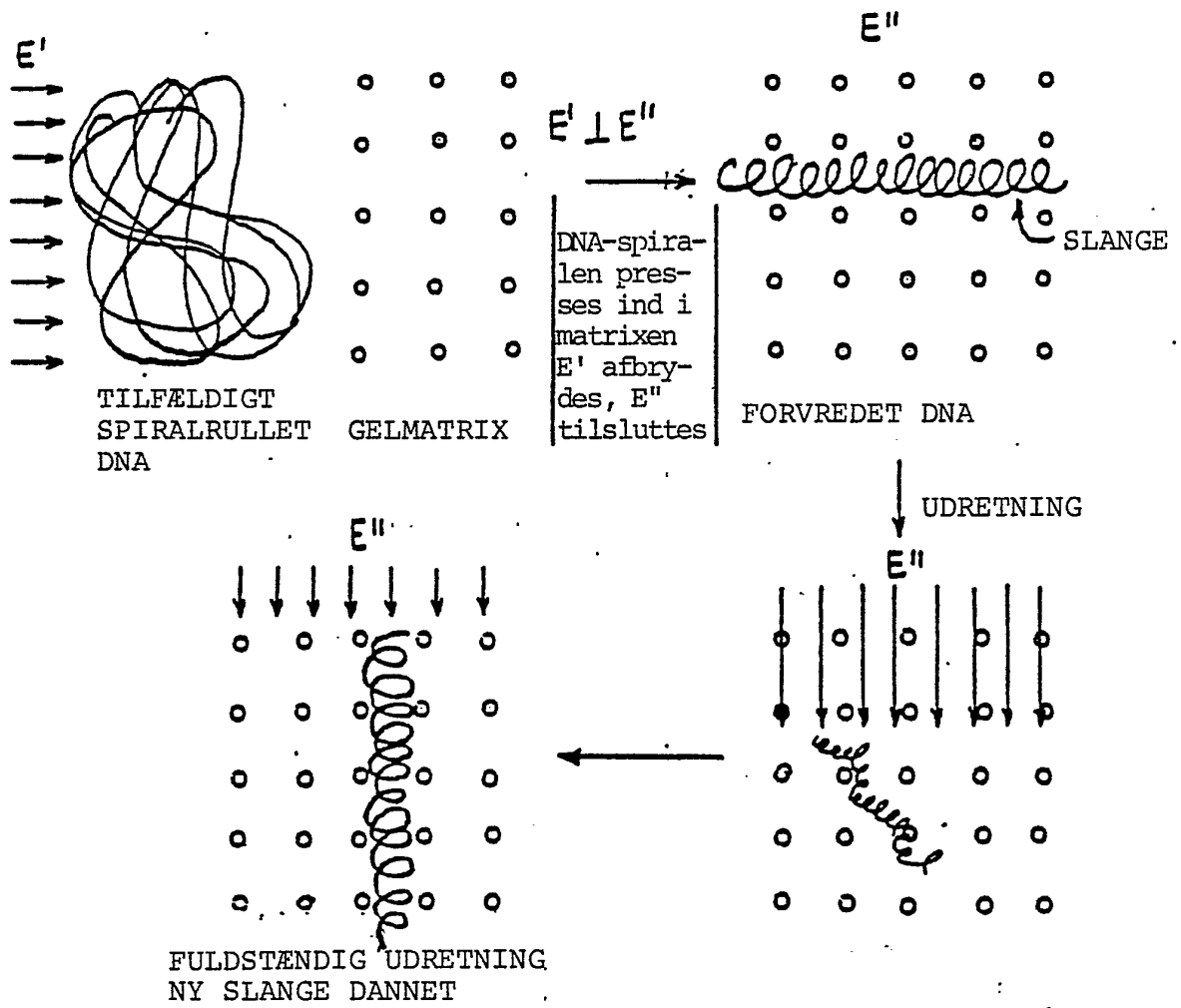


Fig. 9.

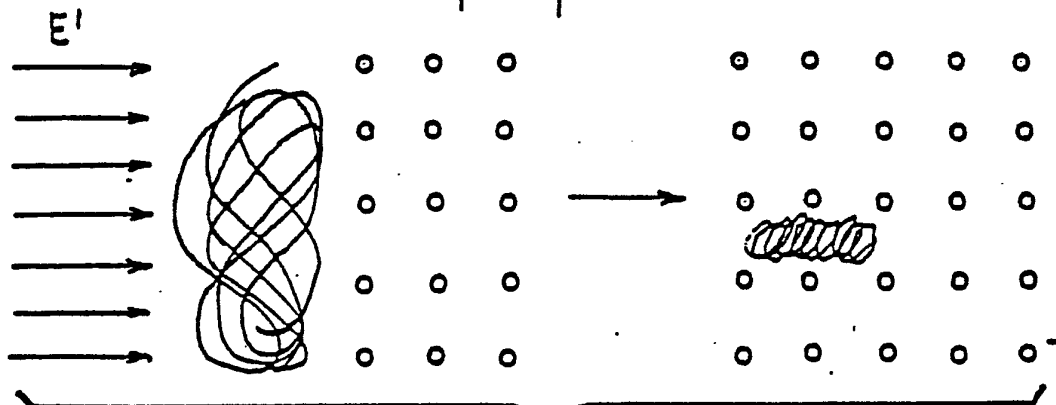


Fig. 10.

Fig. 11.

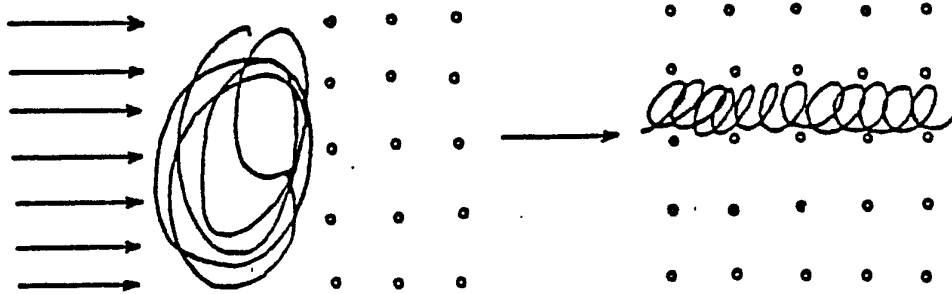


Fig. 12.

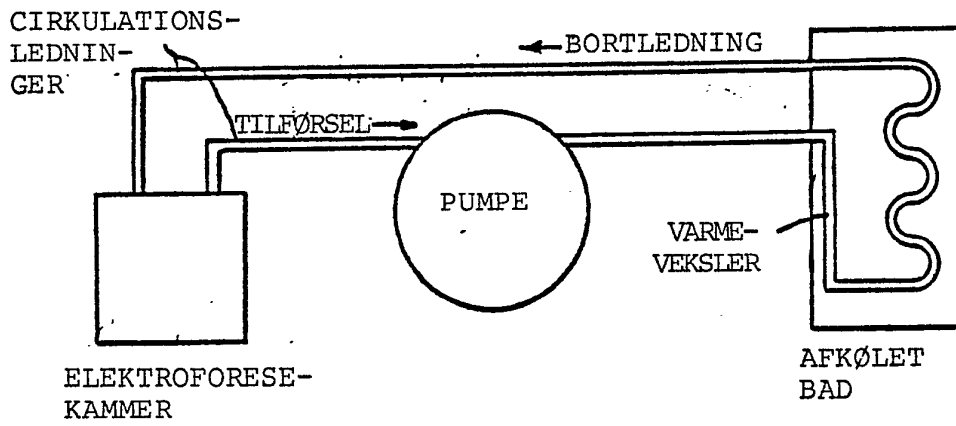


Fig. 13.

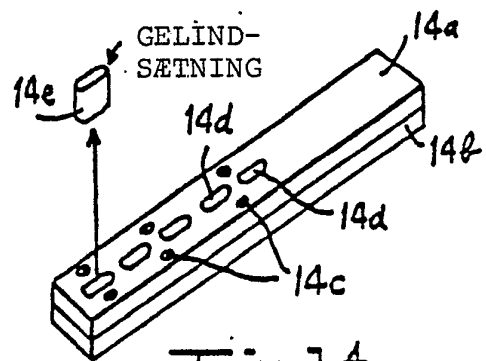
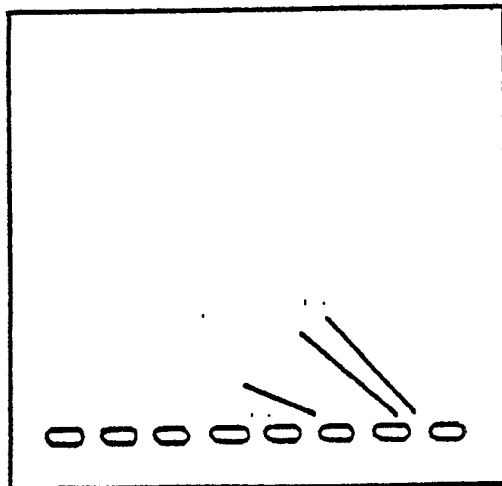


Fig. 14.