

(19) DANMARK



(12) **FREMLÆGGELSESSKRIFT** (11) **146137 B**

DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENET

(21) Patentansøgning nr.: **6016/71**

(51) Int.Cl.³: **G 01 N 33/50**

(22) Indleveringsdag: **09 dec 1971**

(41) Alm. tilgængelig: **22 jun 1972**

(44) Fremlagt: **04 jul 1983**

(86) International ansøgning nr.: –

(30) Prioritet: **21 dec 1970 US 99797**

(71) Ansøger: ***COOPER LABORATORIES INC.; Palo Alto, US.**

(72) Opfinder: **Stanley R. *Johnson; US, Sheldon H. *Forel; US.**

(74) Fuldmægtig: **Th. Ostenfeld Patentbureau A/S**

(54) **Fremgangsmåde samt apparat til udførelse af
geldiffusion**

DK 146137 B

Den foreliggende opfindelse angår en fremgangsmåde og et apparat til udførelse af radiale geldiffusionsundersøgelser på en serie biologiske prøver.

I de senere år er en værdifuld analytisk teknik kendt som geldiffusion blevet udviklet til mængdebestemmelse af forskellige bestanddele i biologiske væsker, såsom blodserum, plasma, urin og cerebrospinal væske. Specielt omfatter en geldiffusionsteknik, der benævnes som radial immunodiffusion, en enkel-diffusions præcipitin reaktion, ved hvilken den ene af reaktanterne inkorporeres i et størknet gelmedium, mens den anden reaktant indføres i en brønd eller udboring, hvorfra den får lov at diffundere ind i gelen.

Enkelt radial immunodiffusion anvendtes sandsynligvis først af Petri ved hans studier af bakteriekoloniers vækst på gelerede medier indeholdende specifikke antisera. Brit. J. Exp'l. Path. 13, 380 (1932). Den radiale immunodiffusionsteknik videreudvikledes af andre videnskabsmænd og især af Mancini, som bidrog væsentligt til denne teknik med kinetiske studier af systemet. Immunochemistry 2., 235-254 (1965).

Ved en praktisk udformning af radial geldiffusion dispergeres et biokemisk aktivt stof, fx. antiserum, i et flydende geldannende middel, fx. smeltet agar, der fordeles i en lav beholder eller plade og får lov at størkne. Når en biokemisk bestemmelse skal udføres, gennemhulles den størknede gels overflade med ca. lige store intervaller til frembringelse af små cylindriske huller eller brønde. Den biologiske væske, som skal undersøges, fx. en legemsvæske, såsom blodserum, indføres så i brønden, fx. ved pipettering. Beholderen sættes så til side eller inkuberes i et givent tidsrum, sædvanligvis i en konventionel fugtighedskasse. På et udvalgt tidspunkt undersøges gelens overflade. Resultanten er et ringformet areal omkring hver brønd, ind i hvilket sera eller andre legemsvæsker er migreret. Sera eller andre legemsvæsker vil gennemgå en grad af vekselvirkning med antistofferne i gelen til dannelse af et cirkulært areal af skelnelig udfældning. Udfældningsarealet målt over for en udformet skala vil tilvejebringe en kvantitativ bestemmelse med hensyn til den særlige udførte prøve.

Den type immunokemisk afprøvningsmetode er især nyttig ved kvantitativ identificering af følgende blodproteiner: Human IgG, IgM,

IgA, IgD, IgE, transferin, ceruloplasmin, α_2 -makroglobulin, complement C3, (β_1 -C/ β_1 -A globulin), albumin, præalbumin, hemopexin, fibrinogen, α_1 -syre-glycoprotein (orosomucoid), α_1 -antitrypsin, hæmoglobin, α_2 -HS-glycoprotein, β_1 -lipoprotein, β_2 -glycoprotein, og C-reaktivt protein.

I kraft af, at de antisera eller antistoffer, der benyttes i gelen, er forholdsvis kostbare, er der gjort forsøg på at anvende så lille et areal som det er muligt at forene med opnåelse af gode resultater. I Clin. Chim. Acta 21, 517-520 (1968) foreslår forfatterne Lopez og Golder brug af antistofmateriale til gelen i små agarskiver. Antigen, som anbringes i en central brønd i hver skive, får lov at diffundere igennem agaren til dannelsen af koncentriske ringudfældninger. Dette apparat er vanskeligt at fremstille p.g.a. kravet om særskilte skiver og er ikke let at fylde ensartet og nøjagtigt p.g.a. de særskilte gel- og antiseraudstøbninger, som kræves til hver af de individuelle skiver.

I et andet forsøg på sparsommelighed er en lav beholder blevet begrænset til en størrelse på 2,5 gange 7,5 cm. I et sådant apparat har det vist sig, at der kan anbringes 6 brønde med lige stort mellemrum uden at forårsage overlappning i de koncentriske frembragte udfældede arealer. Et sådant apparat er illustreret i en rapport af Lou og Shanbrom, J. Amer. Med. Ass'n. 200, side 323 (1967).

Endelig er beholderen i endnu et forsøg på at opnå besparelse blevet modificeret med barrierevægge, således at arealet indeholdende agaren er formindsket til et areal på 1,3 gange 7,5 cm. Imidlertid frembringer et sådant lille areal med 6 brønde ikke kvalificerede resultater. I dette arrangement udgør barriererne sidevægge i længderetningen, hvilke sidevægge er parallelle med en indbyrdes afstand på kun 1,3 cm. Denne forholdsvis lille afstand forårsager en konkav menisk på agargelen og en relativ dehydrering deri, hvorved resultaterne af diffusionsprøven forvrænges ved at antigenet trækkes i ikke-cirkulære mønstre.

Kort sagt har hidtil anvendte beholdere med lille areal til radial geldiffusion i almindelighed frembragt forvrængede diffusionszoner og ugyldige undersøgelsesresultater eller har været upraktiske at fremstille og benytte ved kommercielle anvendelser. Ved små geloverflader, som er begrænset af lineære eller rette kanter, hvad enten

det er ydre eller indre barrierer, vil man støde på følgende problemer:

05 1) Hvis brøndene er anbragt for tæt sammen, indvirker reaktionszonerne på hinanden og forhindrer derved dannelsen af runde præcipitinzoner.

2) Hvis brøndene befinder sig længere fra hinanden, men tættere ved beholderens eller pladens kanter, forekommer følgende:

10 Når zonerne nærmer sig pladens kanter, trækkes ringene imod barrieren, indtil udfældningszonerne enten tangerer barrieren (eller kanten) eller bliver spidse eller kantede de steder af ringen, som er tættest på barrieren (eller kanten).

Af det foregående fremgår, hvori problemet består, nemlig i at benytte den mindst mulige mængde af gelen og den biokemisk aktive bestanddel deri, som kan forenes med gode resultater.

15 Den foreliggende opfindelse tilvejebringer i overensstemmelse hermed en fremgangsmåde til udførelse af radiale geldiffusionsundersøgelser på en serie biologiske prøver, hvorved prøverne bringes i kontakt med en gel indeholdende en passende biokemisk aktiv reaktant for de biologiske prøver ved diffusion fra et antal udboringer i
20 gelens overflade, hvilken fremgangsmåde er ejendommelig ved, at den anvendte gel er indeholdt i mindst én reces i en beholders øvre overflade, hvilken reces har bueformede indsnit i hver af sidevæggene, hvorhos de bueformede indsnit i en af sidevæggene befinder sig over for de bueformede indsnit i den anden sidevæg, hvorved
25 der afgrænses et antal rum, som hver især er forbundet med i det mindste et andet rum ved indsnævringer i recessen.

Opfindelsen tilvejebringer desuden et apparat til brug ved ovennævnte fremgangsmåde til udførelse af radiale geldiffusionsundersøgelser på en serie biologiske prøver, hvilket apparat er ejendommeligt ved, at det omfatter en beholder, som er forsynet med
30 mindst én reces i sin øvre overflade, hvilken reces har bueformede indsnit i hver af sidevæggene, hvorhos de bueformede indsnit i en af sidevæggene befinder sig over for de bueformede indsnit i den anden sidevæg, hvorved der afgrænses et antal rum, som hver især
35 er forbundet med i det mindste et andet rum ved indsnævringer i recessen.

Opfindelsen beskrives i det følgende nærmere i forbindelse med tegningen, hvor

Fig. 1 er et perspektivisk billede ovenfra af geldiffusionsapparatet med låget på plads,

fig. 2 det samme billede som i fig. 1 med låget løftet fra den lave beholder,

05 fig. 3 et endebillede af geldiffusionsapparatet med låget på plads,

fig. 4 et tværsnitsbillede taget langs linien 4-4 i fig. 1,

fig. 5 et planbillede ovenfra af den lave beholder,

10 fig. 6 et perspektivisk billede ovenfra af en anden udformning af geldiffusionsapparatet med låget på plads,

fig. 7 det samme billede som i fig. 6, med låget løftet fra denne udformning af den lave beholder,

fig. 8 et endebillede af denne udformning,

fig. 9 et tværsnitsbillede taget langs linien 9-9 i fig. 6,

15 fig. 10 et planbillede ovenfra af denne udformning,

fig. 11 et planbillede ovenfra af den lave beholder i endnu en udformning, og

fig. 12 et planbillede ovenfra af den lave beholder i en yderligere udformning.

20 Der henvises til fig. 1 for en betragtning af geldiffusionsapparatet 11 ifølge den foreliggende opfindelse. En del af den lave beholder 12 kan ses stikkende frem under låget 13. Det vil bemærkes, at geldiffusionsapparatet ifølge opfindelsen i dette tilfælde har en overvejende rektangulær form med en forholdsvis ringe samlet lodret
25 højde. Ved betragtning af fig. 2 fås et klarere billede af den lave beholder 12, som frembyder en rektangulær pladeform og har en større del forsat på et flertal af siderne til tilvejebringelse af en skulder 14 på hver side af denne art. Som det ses, strækker den lave beholders vandrette ledekanter 15 sig længere ud end låget 13.

30 Låget 13 omfatter en forholdsvis flad øverste del 16. Denne flade øverste del 16 har nedad- og udadrettede sidevægge 17 og tilsvarende endevægge 18. Den lave beholders 12 opadtil endende sidevægge 19 og endevægge 20 hælder indad. Lågets indre tværsnitsdimensioner er større end tværsnitsdimensionerne langs den lave beholders 12 top, men mindre end tværsnitsdimensionerne noget under den lave beholders top. Disse dimensioner gør det muligt for låget
35 at hvile på den lave beholders respektive ende- og sidevægge. Ved

benyttelse af et låg med ende- og sidevægge af tilstrækkelig højde hviler den flade øverste dels 16 underside ikke på den lave beholders overflade, men er passende lodret forskudt derfor. Fig. 3 viser ved fremstilling af et endebillede arten af det stablingsforhold, 05 som opnås imellem låget og den lave beholder. Tværsnitsbilledet i fig. 4 understreger yderligere dette billede. Det vil kunne ses af figurerne 3 og 4, at toplukkets nedadrettede kanter ikke ligger an imod skulderens 14 øvre overflade.

Den lave beholder 12 har, som det kan ses af figurerne 2 og 10 5, en langstrakt reces 23 med en bund 22. Recessens sidevægge 24 har et antal med mellemrum anbragte bueformede indsnit 25. De bueformede indsnit i en sidevæg befinder sig direkte over for de bueformede indsnit i den anden sidevæg. De af modstående indsnit dannede buer afgrænser hver især afsnit, som udgør ca. 1/4 imaginær 15 cirkel. Recessen ser derfor ud som om den er fremkommet ved fjernelse af de imellem et antal cirkulære recesser liggende dele, således at alle recesserne nu er i forbindelse med hinanden. En vigtig fordel ved dette arrangement er, at det flydende geldannende materiale kan indføres et hvilket som helst sted i recessen 23. Det geldannen- 20 de materiale, som er flydende, vil så strømme ind i recessens 23 andre dele eller rum, hvorved indførelse af det geldannende materiale i individuelle undersøgelseszoner undgås.

Materialet til fremstilling af geldiffusionsapparatet ifølge den foreliggende opfindelse kan være et formstof, såsom et stift gennem- 25 sigtigt eller gennemsinneligt formstof. I et sådant tilfælde kan låget 13 og den lave beholder 12 fremstilles ved sprøjttestøbningsmetoder. I fig. 4 kan det ses, at den lave beholder er underskåret langs sin bund. Ved benyttelse af gennemsigtigt materiale kan diffusionsgraden ved undersøgelsesforløbet let konstateres igennem bunden såvel 30 som igennem toppen uden behov for fjernelse af låget 13.

Egnede gennemsigtige formstoffer til fremstilling af geldiffusionsapparatet ifølge opfindelsen er fx. polystyren, polycarbonat, polyethylen, methylnmethacrylat eller "TPX" (methylpentenpolymer).

Opmærksomheden henledes nu på figurerne 6-10. Disse figurer 35 svarer hhv. til figurerne 1-5, som er diskuteret detaljeret ovenfor. Figurerne 6-10 forestiller en anden udformning. Det vil imidlertid kunne ses, at denne modifikation primært angår tilvejebringelsen af

to parallelle recesser 31 og 32, som hver især har en form, som svarer til formen af den ovennævnte reces 23. Ved denne udformning kan det være bekvemt at tilvejebringe en noget større lav beholder for at skaffe plads til de to recesser. Da denne udformning i andre henseender i det væsentlige svarer til den første udformning, synes det ikke nødvendigt at beskrive delene som før.

Fig. 11 er et planbillede ovenfra af en anden udformning, hvor den lave beholder har cirkulær form og recessen 35, hvis vægge har bueformede indsnit, er af ringformet beskaffenhed. Naturligvis vil låget være cirkulært ved denne udformning. I endnu en udformning, som vist i fig. 12, er recessen 41 udformet som et kvadrat med et tværben 42. I denne udformning vil hele apparatet i almindelighed have kvadratisk form, idet låget også vil have denne form. Det vil af det foregående tydeligt fremgå, at recesserne, som er beregnet til at indeholde gelmediet, kan anbringes i et antal rækker og antage yderligere forskellige konfigurationer.

Fordelen ved de i figurerne 6-12 viste udformninger er, at kombinationer af individuelle recesser på samme plade tillader forskellige undersøgelser at blive udført på forskellige tidspunkter uden at tidligere reaktionszoner trænger ind i de ubenyttede dele af gelen på pladen. Således kan der, hvis recesserne er anbragt i rækker på en plade, som i figurerne 6-10, ikke være nogen indvirkning imellem rækker af brønde, fordi hver serie af brønde er indesluttet i sin reces. Tilsvarende kan der, hvis recessen er anbragt i en cirkulær form på en plade, som i fig. 11, ikke være nogen indvirkning hen over cirklen. Ved plader ifølge den kendte teknik, som indeholder et antal brønde, fx. 24 brønde på en enkelt geloverflade, går til sammenligning, efter at adskillige af brøndene er blevet benyttet, nogle af de resterende ubenyttede brønde sædvanligvis tabt for yderligere brug p.g.a. indvirkning fra de benyttede brønde.

Ved brug gennemhulles det af et sæt modstående bueformede indsnit beskrevne område eller rum til frembringelse af en enkelt brønd pr. rum. Ifølge en udførelsesform for opfindelsen vælges dimensionerne således, at arealet af hvert rum ligger fra ca. 109 til ca. 116 og fortrinsvis på ca. 114 mm². Et rum med en diameter på ca. 12 mm er særdeles egnet. Som følge af den enestående udnyttelse af de bueformede indsnit i recessens sidevægge er geldiffusions-

apparatet ifølge opfindelsen med det ovennævnte areal pr. rum i stand til at udføre nøjagtige fuldt udviklede proteinbestemmelser, som hidtil har krævet gelmediumarealer i intervallet fra ca. 161 til ca. 387 mm² pr. brønd.

05 Geldiffusionszonen bestemmes af aktiviteten og mængden af antigen, antistof eller andet biokemisk aktivt stof, der er indeholdt i gelen, og koncentrationen af det tilsvarende reaktantstof, der er indeholdt i prøven i brønden. Den anerkendte konventionelle teknik kræver, at specificiteten af den antigen- eller antistofholdige gel
10 frembringer diffusionsringe med en diameter på ikke mindre end ca. 3,0 mm, fordi mindre zoner ikke er tilstrækkeligt følsomme til nøjagtige kvantitative resultater. Dette krav er baseret på brugen af en brønd af standardstørrelse på ca. 2,5 mm i diameter, hvilket efterlader en radius på i det mindste ca. 0,25 mm på hver side af brønden med en minimal diffusionsring på 3,0 mm i diameter omkring
15 brønden. Fortrinsvis ligger geldiffusionszonediametre i intervallet fra ca. 3,5 til ca. 9,0 mm for at tilvejebringe den ønskede følsomhed og præcision ved mængdebestemmelse.

 En anden dimension af interesse er recessens 23 dybde, som
20 fx. er fra ca. 2 til ca. 5 og fortrinsvis ca. 2,5 mm dyb, idet recessen som angivet er temmelig lav. I almindelighed vil recessen, som vist i figurerne 1-5, fx. have et volumen på fra ca. 1,4 til ca. 1,6 ml. Når udformningen med to rækker, som vist i figurerne 6-10, benyttes, er det totale volumen af størrelsesordenen fra ca. 2,8 til
25 ca. 3,2 ml. En lav beholder med ydre mål på ca. 3,8 gange 9,5 cm kan faktisk rumme to rækker recesser. Med dimensioner af den nævnte størrelsesorden kan almindeligvis tilvejebringes seks rum eller zoner, når der benyttes en enkelt reces, mens tolv rum tilvejebringes med to recesser.

30 I praksis indeholder hver af beholderens recesser mindst fire rum, hvoraf tre i almindelighed vil blive benyttet til kontrolprøver med tre forskellige aktivitetsniveauer og en eller flere vil blive benyttet til den ukendte prøve.

 Ved fremstilling af gelmediet kan et hvilket som helst konventionelt geldannelsesmiddel benyttes, fx. gelatine, pectin, silicagel, stivelse, polysaccharider fra tang eller alger, såsom agar, algin og carragenin, rensed agarose, fx. fremstillet ved de i USA patentskrif-

35

terne nr. 3.281.409, 3.335.127 og 3.362.884 beskrevne fremgangs-
måder, syntetiske polymere geldannelsesmidler, såsom det tværbund-
ne polyacrylamid, der er omhandlet i beskrivelsen til USA patent
nr. 3.046.201, den modificerede cellulose, der er omhandlet i beskri-
05 velsen til USA patent nr. 3.360.440 og lignende materialer.

Gelmaterialet kan indeholde mindre mængder af forskellige addi-
tiver, såsom fx. puffermaterialer, præserveringsmidler, beskyttel-
sesmidler, elektrolyter, overfladeaktive midler og lignende stoffer,
til dels afhængende af den specifikke undersøgelse, som skal udfør-
10 res med geldiffusionsapparatet ifølge opfindelsen.

Apparatet kan fx. benyttes til mængdebestemmelse af små kon-
centrationer af antigener, antistoffer, enzymer, hormoner, proteiner,
steroider, produkter af carbohydrat, protein og lipid metabolisme,
antibiotika og andre medikamenter og medicinalvarer, som indgives
15 til behandling af sygdomme, og lignende bestanddele af biologiske
væsker, såsom blodserum, plasma, urin og cerebrospinal væske.

Eksempler på radiale diffusionsundersøgelser, hvortil apparatet
er egnet, er prøver for hormoner, såsom HCG, som omhandlet i be-
skrivelsen til USA patent nr. 3.171.783, prøver for DPNH-bundne
20 enzymer, såsom LDH, og hydrolytiske enzymer, såsom amylase, prø-
ver for blodkoagulationsbestanddele, såsom plasmin og plasminogen,
samt thrombin og prøver for komplementbindingsantistoffer.

PATENTKRAV

1. Fremgangsmåde til udførelse af radiale geldiffusionsundersøgelser på en serie biologiske prøver, hvorved prøverne bringes i kontakt med en gel indeholdende en passende biokemisk aktiv reaktant for de biologiske prøver ved diffusion fra et antal udboringer i gels overflade, KENDETEGNET ved, at den anvendte gel er indeholdt i mindst én reces i en beholders øvre overflade, hvilken reces har bueformede indsnit i hver af sidevæggene, hvorhos de bueformede indsnit i en af sidevæggene befinder sig over for de bueformede indsnit i den anden sidevæg, hvorved der afgrænses et antal rum, som hver især er forbundet med i det mindste et andet rum ved indsnævringer i recessen.

2. Apparat til brug ved fremgangsmåden ifølge krav 1 til udførelse af radiale geldiffusionsundersøgelser på en serie biologiske prøver, KENDETEGNET ved, at det omfatter en beholder (12), som er forsynet med mindst én reces (23, 31, 32, 35, 41) i sin øvre overflade, hvilken reces har bueformede indsnit (25) i hver af sidevæggene, hvorhos de bueformede indsnit i en af sidevæggene befinder sig over for de bueformede indsnit i den anden sidevæg, hvorved der afgrænses et antal rum, som hver især er forbundet med i det mindste et andet rum ved indsnævringer i recessen.

3. Apparat ifølge krav 2, KENDETEGNET ved, at det af et sæt modstående bueformede indsnit i recessens sidevægge beskrevne areal ligger i intervallet fra ca. 109 til ca. 116 mm² pr. rum.

4. Apparat ifølge krav 2 eller 3, KENDETEGNET ved, at recessens dybde ligger i intervallet fra ca. 2 til ca. 3 mm.

5. Apparat ifølge krav 2, 3 eller 4, KENDETEGNET ved, at recessen (23, 31, 32) er langstrakt.

6. Apparat ifølge krav 2, 3 eller 4, KENDETEGNET ved, at recessen (35) er ringformet.

7. Apparat ifølge krav 2, 3 eller 4, KENDETEGNET ved, at recessen (41) har firkantet form.

Fremdragne publikationer:

DE fremlæggeskrift nr. 1598163

FR patent nr. 1598197

Clin.Chim.Acta, 21 (1968), side 517-520.

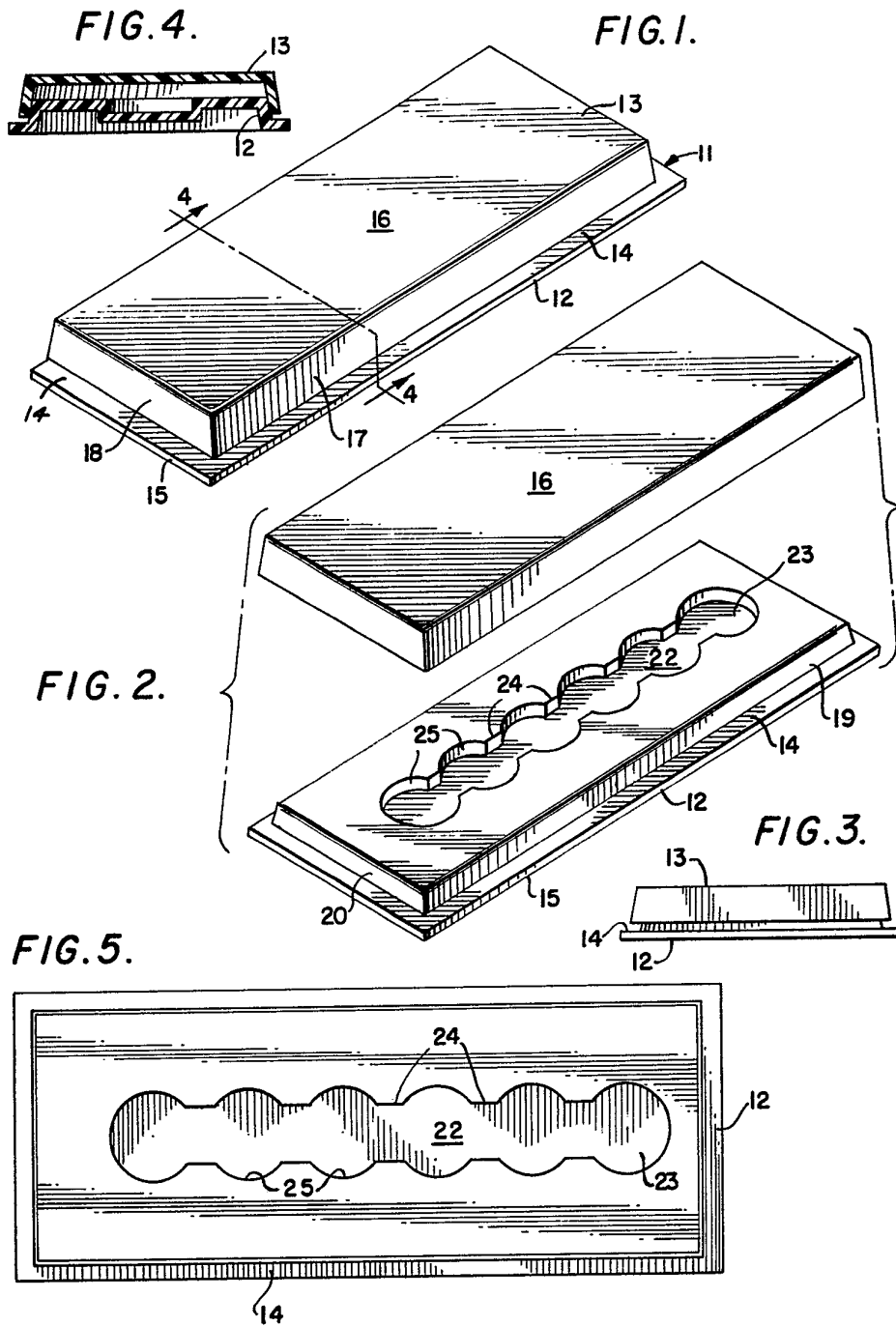


FIG. 6.

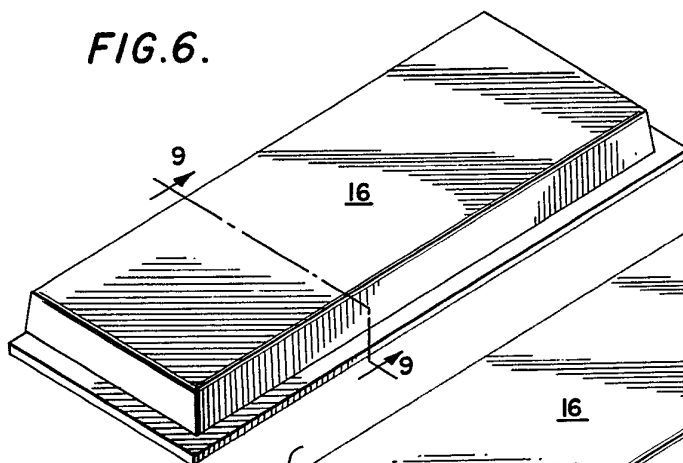


FIG. 7.

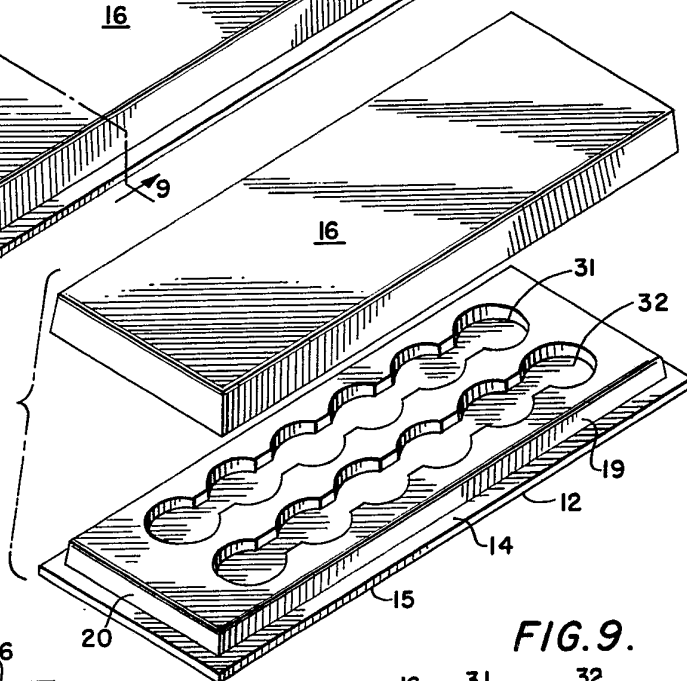


FIG. 8.

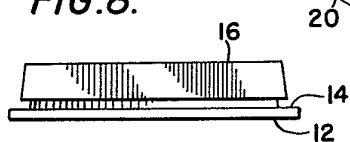


FIG. 9.

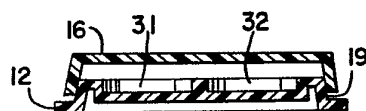


FIG. 10.

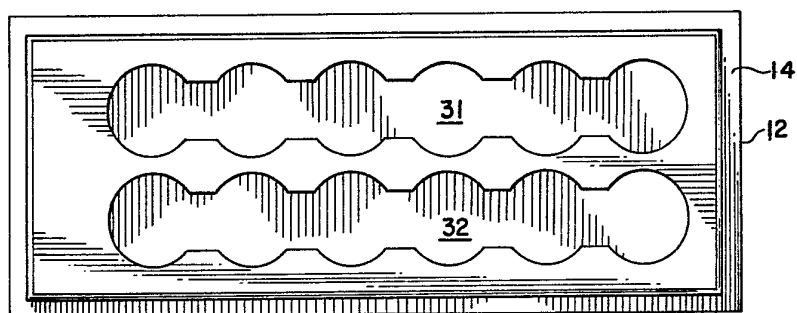


FIG. 11.

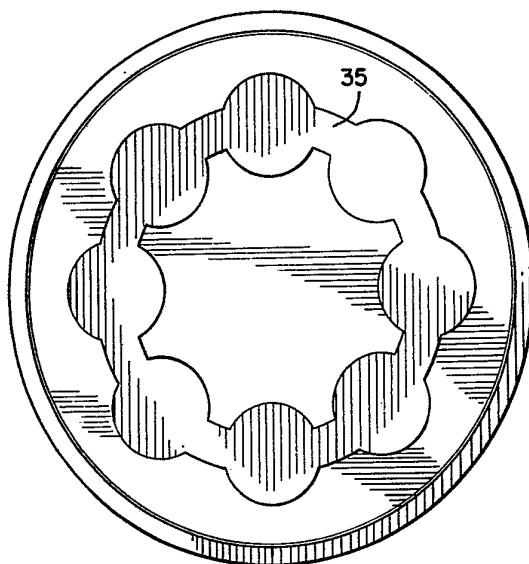


FIG. 12.

