



C (45) Patenti on annettu
1988.11.11

(51) Kv.4/Int.Cl. C 12 M 1/00, C 12 Q 1/68,
C 12 N 15/00

SUOMI-FINLAND

(FI)	(21) Patentihakemus - Patentansökning	875696
	(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag	23.12.87
Patentti- ja rekisterihallitus	(24) Alkuperäisyys - Giltighetsdag	23.12.87
Patent- och registerstyrelsen	(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig	24.06.89
	(44) Nähtäväksipanon ja kuuljulkaisun pvm. - Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	31.08.89
	(86) Kv. hakemus - Int. ansökan	
	(32)(33)(31) Pyydetty etuoikeus - Begärd prioritet	

(71) Orion-yhtymä Oy, Saunatontuntie 1, 02200 Espoo, Suomi-Finland(FI)

(72) Nisse Erkki Juhani Kalkkinen, Espoo, Hans Erik Söderlund, Espoo, Suomi-Finland(FI)

(54) Laite, laitteen osa ja menetelmä nukleiinihappojen amplifioimiseksi -
Apparat, del av en apparat och förfarande för mångfaldigande av
nukleinsyror

(57) Tiivistelmä

Keksintö koskee laitetta, laitteen osaa ja menetelmää nukleiinihappojen amplifikaation suorittamiseksi. Menetelmässä inkuboidaan kohdenukleiinihapon, sopivat alukkeet ja reagenssit sisältävää reaktioseosta kohdenukleiinihapon polymerisoimiseksi astiassa, minkä jälkeen reaktioseos siirretään nukleiinihappojen denaturoimiseksi toiseen astiaan ja denaturoinnin tapahduttua lämmönvaihtimen kautta takaisin alkuperäiseen astiaan. Laite on säädetty siten, että polymerisointi- ja denaturaatioastiat ovat kyseisille reaktioille edullisissa lämpötiloissa.

Menetelmässä käytettävään laitteeseen kuuluu yksi tai useampi astiapari, jonka astiat on kytketty tai kytkettävissä toisiinsa yhdellä tai useammalla putkella sekä nesteensiirtojärjestelmä. Yksi putkista toimii lämmönvaihtimena tai kulkee sellaisen kautta. Molemmat astiat on varustettu termostoitavalla lämmön-säätimellä.

(57) Sammandrag

Uppfinningen avser en apparat, en del av apparat och ett förfarande för mångfaldigande av nukleinsyror. Enligt förfarandet inkuberar man först i en behållare en reaktionsblandning, som innehåller nukleinsyran, lämpliga primers och reagenser, för att polymerisera nukleinsyran. Efter polymeriseringen överflyttas reaktionsblandningen till en annan behållare för denaturering av nukleinsyror. Efter denatureringen överflyttas reaktionsblandningen via en värmeväxlare till den ursprungliga behållaren. Apparaten är så reglerad, att temperaturen i polymeriseringsbehållaren och i denatureringsbehållaren hålls optimal. Apparaten innehåller ett vätsketransportsystem samt ett eller flera par av behållare, och varje behållare i ett par är sammankopplad med en eller flera rörledningar. En av dessa rörledningar verkar som värmeväxlare eller passerar genom densamma. Båda behållarna är utrustade med en termostaterad värmeregulator.

Laite, laitteen osa ja menetelmä nukleiinihappojen
amplifioimiseksi

Tämä keksintö koskee laitetta ja menetelmää nukleiinihappojen
amplifikaation suorittamiseksi automaattisesti standardoi-
duissa olosuhteissa. Keksintö koskee myös menetelmässä
käytettävän laitteen kertakäyttöistä osaa.

Nukleiinihappojen amplifikaatio on kuvattu patenteissa
US 4,683,194, US 4,683,195 ja US 4,683,202 sekä patenttihak-
muksissa EP 200 362, EP 229 701, EP 237 362 ja US 024 604.
Amplifikaatiossa reaktioseos, joka sisältää kohdenukleiini-
happoa, vähintään kaksi sopivaa aluketta (primers), neljää
eri deoksinukleosiditrifosfaattia sekä DNA-polymeraasia
sopivassa puskuriliuoksessa, inkuboidaan ensin sopivassa
lämpötilassa DNA:n polymerisoimiseksi. Tämän jälkeen poly-
merisaatiossa muodostunut kaksisäikeinen DNA denaturoidaan
kuumentamalla ja reaktioseos jäähdytetään lämpötilaan, jossa
alukkeet hybridisoituvat kohde-DNA:n kanssa. Tarvittaessa
muutetaan reaktioseoksen lämpötila DNA-polymeraasin toiminnan
kannalta optimaaliseen lämpötilaan ja lisätään DNA-polyme-
raasia. Edellä kuvatut vaiheet toistetaan niin monta kertaa
kuin on tarpeen halutun tuloksen aikaansaamiseksi.

Amplifikaatio on yleensä suoritettu käsin siirtämällä
koeputkia paikasta toiseen kymmeniä kertoja. Menetelmä on
hidas ja hankala suorittaa. Käytettäessä lämpöherkkää
polymeraasia putkia on pitänyt avata ja sulkea välillä.
Lisäksi jäähdytysvaiheen aikana kondensoitunut reaktioneste
on pitänyt sentrifugoida putkien seinämistä homogeenisen
reaktionesteen aikaansaamiseksi. Prosessia ei ole näin ollen
voitu automatisoida. Edelleen haittana on ollut se, että
reaktio-olosuhteet eivät välttämättä ole pysyneet aivan
samoina toistettaessa. Tämä on ollut ongelmana erityisesti
lämmönkestävää entsyymiä käytettäessä, sillä lämmönkestä-
vydestään huolimatta polymeraasi tuhoutuu herkästi, jos sitä
pidetään liian kauan denaturaatiolämpötilassa.

Patenttihakemuksessa EP 236 069 on kuvattu laite, jossa nukleiinihappoamplifikaatio suoritetaan tietokoneohjatusti lämmittämällä ja jäähdyttämällä reaktioseosta samassa astiassa. Tässä laitteessa voidaan käyttää ainoastaan lämmönkestävää polymeraasientsyymiä. Käytännössä lämmönkestävä polymeraasi on aktiivinen ainoastaan muutaman reaktiosyklin ajan. Reaktioseoksen lämmittäminen ja jäähdyttäminen tarkasti ja riittävän nopeasti on vaikeaa, koska reaktioastian ja siinä olevan reaktioseoksen lisäksi joudutaan muuttamaan myös ympäröivän laitteen lämpötila. Ympäröivän laitteen lämpökapasiteetti on taas pakostakin huomattavan suuri verrattuna pienitilavuuksisen (noin 100 μ l) reaktioseoksen lämpökapasiteettiin. Tämän vuoksi reaktioseos joutuu helposti olemaan amplifikaatiolle epäedullisissa olosuhteissa liian kauan. Erityisesti ongelmia aiheutuu denaturaatiolämpötilan ja -ajan säädöstä. Mikäli lämpötila on liian alhainen, ei denaturaatio etene amplifikaation kannalta toivotulla tavalla. Toisaalta, mikäli polymeraasientsyymi joutuu olemaan liian kauan denaturaatiolämpötilassa, se tuhoutuu.

Tämän keksinnön tarkoituksena on aikaansaada laite ja menetelmä edellämainittujen haittojen poistamiseksi. Nyt keksityllä laitteella voidaan täysin automaattisesti ilman erillisiä työntekijän vaatimia toimenpiteitä suorittaa nukleiinihappojen amplifikaatio yhdestä tai useammasta näytteestä samanaikaisesti standardoiduissa reaktioolosuhteissa. Keksinön mukaisessa laitteessa oikea denaturaatiolämpötila ja -aika voidaan säätää riittävän tarkasti ja nopeasti. Keksinön mukaista menetelmää ja laitetta voidaan käyttää nukleiinihappojen amplifioimiseen riippumatta siitä onko käytetty polymeraasientsyymi lämmönkestävä vai ei.

Keksinnön kohteena on menetelmä nukleiinihappoamplifikaation suorittamiseksi siten että reaktioseosta, joka sisältää yhden tai useamman yksisäikeisen kohdenukleiinihapon, sopivat alukeet, deoksinukleosiditrifosfaatit ja polymeraasientsyymiin

sopivassa puskuriliuoksessa, inkuboidaan polymerisaation suorittamiseksi astiassa, minkä jälkeen reaktioseos siirretään kulloinkin sopivalla menettelyllä nukleiinihappojen denaturoimista varten toiseen astiaan, josta reaktioseos denaturoinnin tapahduttua siirretään takaisin alkuperäiseen astiaan, sopivaa menettelyä käyttäen. Amplifikaatiolaitte on säädetty siten, että astiaa, jossa kohdenukleiinihapon polymerisointi tapahtuu, pidetään polymeraasientsyymin toiminnalle edullisessa lämpötilassa ja astiaa, jossa denaturaatio suoritetaan, pidetään denaturoinnin kannalta edullisessa lämpötilassa. Reaktioseoksen siirto denaturaatio-astiasta polymerisaatioastiaan tapahtuu lämmönvaihtimen kautta. Lämmönvaihtimessa denaturoitu reaktioseos jäähydetään edullisesti lämpötilaan, jossa alukkeiden ja kohde-DNA:n hybridisaatio tapahtuu.

Keksinnön kohteena on myös menetelmässä käytettävä laite. Laitteeseen kuuluu yksi tai useampi, edullisesti rinnakkainen, astiapari. Astiapari koostuu kahdesta astiasta, jotka on kytketty tai kytkettävissä toisiinsa yhdellä tai useammalla putkella. Laite voi olla varustettu erillisellä lämmönvaihtimella, jonka kautta ainakin yksi putkista kulkee tai putki voi toimia sellaisenaan lämmönvaihtimena. Molemmat astiat on varustettu lämmönsäätimellä, esimerkiksi termos-tautila varustetulla lämpöblokillä. Edelleen laitteeseen kuuluu nesteensiirtojärjestelmä reaktionesteen siirtämiseksi astiasta toiseen. Astia, jossa polymerisaatio tapahtuu, voi olla varustettu sopivalla annostelulaitteella polymeraasientsyymin ja/tai reagenssien lisäystä varten.

Keksinnön mukainen menetelmä ja laite on havainnollistettu seuraavissa kuvioissa, joissa

Kuvio 1 esittää polymerisaatiovaihetta ja yleisperiaatetta keksinnön mukaisesta laitteesta,

Kuvio 2 esittää nesteen siirtämistapahtuman astiaan, jossa DNA:n denaturaatio tapahtuu,

Kuvio 3 esittää DNA:n denaturaatiovaihetta,

Kuvio 4 esittää nesteen siirtämistapahtuman takaisin astiaan, jossa polymerisaatioreaktio tapahtuu.

Keksinnön kohteena olevaan kertakäyttöiseen laitteen osaan kuuluu astiaporin ja näitä yhdistävän putken lisäksi astioihin tulevat kaasuputket, joita voidaan käyttää seuraavassa tarkemmin kuvatun keksinnön mukaisen laitteen edullisessa sovellutusmuodossa.

Kuviossa 1 on esitetty eräs edullinen sovellutusmuoto, jossa reaktioseos on astiassa 1, jossa polymerisaatioreaktio tapahtuu. Astiasta 1 johtaa putki 3 astiaan 2. Putki 3 on edullisesti teflonputki, jonka sisähalkaisija on 0,3-0,5 mm. Putken 3 yhteydessä voi mahdollisesti olla erillinen lämmönvaihdin 4. Lämmönvaihdin 4 voidaan korvata myös yksinkertaisesti lisäämällä putken pituutta. Astiat ovat täysin tiiviitä. Putken 3 päiden tulisi päättyä molemmissa astioissa lähelle astian pohjaa, jotta olennaisesti koko nestetilavuus voitaisiin siirtää putkea pitkin toiseen astiaan. Tästä syystä astioiden pohja on edullista muotoilla alaspäin suppenevaksi, siten että nesteet valuvat kapenevaa syvennystä kohden. Putken 3 pää on tietysti edullista sijoittaa tähän syvennykseen. Kumpaankin astiaan 1 ja 2 johtaa myös kaasuputket 5 ja 6. Nämä kaasuputket on yhdistetty venttiilisysteemiin, joka koostuu venttiileistä kuten esim. kolmitiemagneettiventtiileistä 7 ja 8, jotka ovat mikroprosessoriohjattuja. Haluttaessa voidaan venttiilin kautta yhdistää kaasun virtaus jompaankumpaan astiaan, jolloin toiseen astiaan johtavan kaasuputken venttiilin pitää olla deaktivoitu, jotta ylimäärä kaasua pääsisi siirtymään pois ulkoilmaan ja nesteiden virtaus astiasta toiseen tulisi mahdolliseksi. Sopivia kaasuja ovat inerttikaasut, mm. typpi ja argon. Lisäyslaitteen ja siihen kuuluvan putken 9 kautta voidaan tarvittaessa lisätä polymeraasientsyymiä tai muita reagensseja astiaan 1. Amplifioitaessa useita rinnakkaisia näytteitä, voidaan samanlaiset astioista 1 ja 2 koostuvat

astiaparit liittää kaasuputkien 5 ja 6 välityksellä kaasunjakajiin 10, jotka ovat venttiilien 7 ja 8 ohjauksessa. Kuvassa 1 polymerisaatioreaktio on parhaillaan meneillään magneettiventtiilien 7 ja 8 ollessa deaktivoituja eli auki ulkoilmaan. Astia 1 pidetään polymerisaatiolle optimaalisessa lämpötilassa lämmönsäätimen 11 avulla.

Kuviossa 2 polymerisaatioreaktion päätyttyä reaktioseosta ollaan siirtämässä putkea 3 pitkin astiasta 1 astiaan 2 putkea 5 pitkin astiaan 1 tulevan kaasun paineen avulla. Venttiili 7 on siis aktivoitu päästään kaasun virtaamaan astiaan 1. Venttiili 8 on puolestaan deaktivoitu päästään ylimäärän kaasua virtaamaan ulos. Sopiva kaasun paine on edullisesti 0,1 - 1 atm.

Kuviossa 3 denaturaatio tapahtuu astiassa 2, jonka lämpötila on säädetty sopivaksi lämmönsiirtimen 12 avulla. Kumpikin venttiili 7 ja 8 on deaktivoitu, joten nesteiden siirtyminen astiasta toiseen ei ole mahdollista.

Kuviossa 4 reaktioseosta ollaan siirtämässä astiasta 2 astiaan 1 takaisin. Venttiili 8 on aktivoitu päästään kaasun virtaamaan astiaan 2. Kaasun paineesta neste pyrkii siirtymään astiaan 1. Siirto suoritetaan edullisesti sellaisella nopeudella, että hybridisaatioreaktio ehtii tapahtua lämmönvaihtimessa. Venttiili 7 on deaktivoitu, jotta ylimäärä kaasua pääsisi astiaan 1 virtaavan nesteen tieltä pois. Tarvittaessa suoritetaan polymeraasin lisäys putken 9 kautta.

Kuvioissa 1-4 esitetyt vaiheet voidaan toistaa useita jopa kymmeniä kertoja mikroprosessoriohjatusti, joten amplifikaatio tapahtuu automaattisesti alusta loppuun.

Keksintö ei ole rajoitettu mitenkään edellä selostettuun ja kuvioissa 1-4 esitettyyn edulliseen sovellutusmuotoon, vaan useat erilaiset muutokset ovat mahdollisia keksinnöllisen ajatuksen puitteissa. Yllä kuvatussa laitteessa voidaan esimerkiksi käyttää alipainetta ylipaineen asemasta.

Amplifikaatiolaite, jossa nesteensiirto tapahtuu yli- tai alipaineen avulla, mahdollistaa kätevästi useiden kohdenukleiinihapposeosten samanaikaisen käsittelyn, sillä samalla venttiilillä voidaan ohjata kaikissa astioissa olevien reaktioseosten siirtymisen astiasta toiseen. Reaktioseos voidaan myös siirtää astiasta toiseen nestepumpun avulla, jolloin kaasuputkia 5 ja 6 ei tarvita. Tällöin voidaan esimerkiksi käyttää pumppua, jonka virtaussuuntaa voidaan muuttaa, jolloin astioiden 1 ja 2 välillä tarvitaan vain yksi putki 3. Edellä kuvattu nukleiinihappojen amplifikaatio voidaan suorittaa myös ribonukleiinihaposta käänteiskopioijaentsyymin avulla saadulle komplementaariselle DNA:lle.

Amplifikaatioreaktiosarja aloitetaan edullisesti kuvion 1 mukaisesta vaiheesta ts. inkuboidaan amplifikaatiossa tarpeellisia reagensseja ja 1-säikeistä kohdenukleiinihappoa optimilämpötilassa optimaika polymeraasireaktion suorittamiseksi. Mikäli kohdenukleiinihappo on alunperin ollut kaksisäikeinen, se tehdään yksisäikeiseksi ennen ensimmäistä vaihetta. On tietenkin mahdollista käyttää amplifikaatiolaitetta kohdenukleiinihapon denaturoimiseen, jolloin koko reaktiosarja aloitetaan kuvion 3 esittämästä vaiheesta. Tällöin on yleensä edullista käyttää pidempää denaturaatio-aikaa kuin varsinaisen amplifikaation aikana.

Reaktiosarjassa käytettävät optimilämpötilat ja -ajat määräytyvät kohdenukleiinihapon sekä käytettävän alukkeen ja polymeraasientsyymin perusteella. Alan asiantuntija pystyy itse säätämään laitetta ja valitsemaan sopivat olosuhteet kulloinkin suoritettavalle amplifikaatioreaktiolle.

Polymeraasientsyymin lisäyksen suhteen voidaan menetellä usealla tavalla. Entsyymiä voidaan syöttää astiaan, jossa polymeraasireaktio tapahtuu joko jatkuvasti tai jaksotaisesti. Jos entsyymi on lämmönkestävää, sitä laitetaan reaktiosarjan alussa reaktioseokseen ja lisätään tämän jälkeen vain tarvittaessa. Entsyymiä ei tarvitse lisätä lainkaan, jos se on sijoitettu reaktioastiaan joko

immobilisoituna tai sopivana hitaasti vapautuvana annostelumuotona. Jos entsyymi on immobilisoitu se ei tietysti siirry reaktioastiasta. Hitaasti vapautuvaa annostelumuotoa käytettäessä on tärkeätä että polymeraasientsyymin vapautuminen on säädelty siten, että sen konsentraatio on pysyy sopivana niin monen reaktiosyklin ajan kuin on tarpeellista.

Lämmönvaihtimen lämpötila määräytyy käytettävän alukkeen pituuden ja nukleotidijakauman perusteella. Silloin kun alukkeen hybridisaatiolämpötila poikkeaa huomattavasti polymerisaatioentsyymin optimilämpötilasta, reaktioseoksen lämpötilaprofiili säädetään edullisesti siten, että aluke ehtii hybridisoitua jo lämmönvaihtimessa. Lämmönvaihtimen säädössä voidaan myös ottaa huomioon polymerisaatioentsyymin lämpöherkkyys huolehtimalla siitä, että reaktioseosta jäähdytetään riittävästi ennen kuin se joutuu kosketuksiin entsyymin kanssa. Denaturoidun nukleiinihapon sisältävän liuoksen viipymäaika lämmönvaihtimessa voidaan säätää letkun pituuden ja denaturaatioastiaan johdettavan kaasun paineen avulla tai vastaavasti alipainetta tai nestepumpun tehoa säätämällä.

Patenttivaatimukset

1. Laite nukleiinihappojen amplifioimiseksi t u n n e t t u siitä, että siihen kuuluu yksi tai useampi putken tai putkien (3) yhdistämien astioiden (1,2) muodostama astiapari, joka astiapari koostuu polymerisaatioastiasta (1) polymerisaatiovaihetta varten ja denaturaatioastiasta (2) denaturaatiovaihetta varten, sekä polymerisaatioastian tai -astioiden (1) lämpötilaa säätelevä lämmönsäädin (11), jolla lämmönsäätimellä voidaan polymerisaatioastia tai -astiat pitää nukleiinihappojen polymerisaatiolle optimaalisessa lämpötilassa, ja denaturaatioastian tai -astioiden (2) lämpötilaa säätelevä lämmönsäädin (12), jolla lämmönsäätimellä voidaan denaturaatioastia tai -astiat pitää nukleiinihappojen denaturaatiolle optimaalisessa lämpötilassa, sekä nesteensiirtojärjestelmä, jolla reaktionestettä voidaan siirtää astiasta (1,2) toiseen putken tai putkien (3) kautta.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen laite t u n n e t t u siitä, että nesteensiirtojärjestelmään kuuluu astiaparissa tai astiapareissa oleviin astioihin (1,2) tulevat kaasuputket (5,6) ja kaasun virtausta säättävät venttiilit (7,8).

3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen laite t u n n e t t u siitä, että putki (3) kulkee erillisen lämmönvaihtimen (4) kautta.

4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen laite t u n n e t t u siitä, että siihen kuuluu lisäksi annostelulaite ja -putki (9) reagenssien ja/tai näytteen lisääystä varten.

5. Patenttivaatimuksen 2 mukainen laite t u n n e t t u siitä, että venttiilit (7,8) toimivat mikroprosessoriohjauksella.

6. Patenttivaatimuksen 2 mukainen laite t u n n e t t u siitä, että kaasuputket (5,6) on yhdistetty kaasunjakajiin (10), jotka ovat venttiilien (7,8) ohjauksessa.

7. Patenttivaatimuksen 1 mukainen laite t u n n e t t u siitä, että astioita (1,2) yhdistävä putki (3) ulottuu astioiden pohjalle asti.

8. Patenttivaatimuksen 1 mukainen laite t u n n e t t u siitä, että astioiden (1,2) pohja on alaspäin suppeneva.

9. Patenttivaatimuksen 4 mukainen laite t u n n e t t u siitä, että reagenssien annostelulaite toimii jatkuvasti.

10. Patenttivaatimuksen 4 mukainen laite t u n n e t t u siitä, että reagenssien annostelulaite toimii jaksoittain.

11. Patenttivaatimusten 1 ja 2 mukainen laitteen osa, johon kuuluu putken (3) yhdistämä astioiden (1,2) muodostama astiapari ja astioihin (1,2) tulevat kaasuputket (5,6) t u n n e t t u siitä, että laitteen osa on kertakäyttöinen.

12. Patenttivaatimuksen 1 mukaisella laitteella suoritettu menetelmä nukleiinihappojen amplifioimiseksi t u n n e t - t u siitä, että suoritetaan seuraavat vaiheet:

- a) inkuboidaan polymerisaatioreaktiossa tarpeelliset reagenssit ja yksisäikeistä kohdenukleiinihappoa sisältävä reaktioseos
- b) denaturoidaan reaktioseoksessa oleva kaksisäikeinen nukleiinihappo kuumentamalla
- c) jäädytetään reaktioseos
- d) lisätään tarvittaessa DNA-polymeraasia
- e) toistetaan sama reaktiosykli uudestaan kulloinkin sopiva määrä kertoja siten, että vaiheet a) ja b) suoritetaan erillisissä astioissa (1,2), joiden lämpötilat pidetään koko

ajan kullekin vaiheelle sopivina.

13. Patenttivaatimuksen 12 mukainen menetelmä t u n n e t -
t u siitä, että denaturoitu nukleiinihappo jäähdytetään
ennen siirtoa astiaan, jossa polymerisaatio tapahtuu.

14. Patenttivaatimuksen 12 mukainen menetelmä t u n n e t -
t u siitä, että reaktionesteen siirto astiasta toiseen
tapahtuu kaasun paineen avulla.

15. Patenttivaatimuksen 12 mukainen menetelmä t u n n e t -
t u siitä, että polymeraasientsyymiä lisätään jatkuvasti.

16. Patenttivaatimuksen 12 mukainen menetelmä t u n n e t -
t u siitä, että polymeraasientsyymi lisätään jaksottain.

17. Patenttivaatimuksen 12 mukainen menetelmä t u n n e t -
t u siitä, että polymeraasientsyymi on immobilisoituna
reaktioastiassa.

18. Patenttivaatimuksen 12 mukainen menetelmä t u n n e t -
t u siitä, että polymeraasientsyymi on hitaasti vapautuvana
annostelumuotona reaktioastiassa.

Patentkrav

1. En apparat för mångfaldigande av nukleinsyror, k ä n n e t e c k n a d därav, att den omfattar ett eller flera par av behållare, och varje behållare (1,2) i ett par är sammankopplad med en eller flera rörledningar (3), vilket par av behållare består av en polymerisationsbehållare (1) för polymerisationsfasen och av en denaturationsbehållare (2) för denaturationsfasen, samt av en reglerande värmeväxlare (11), som reglerar polymerisationsbehållarens eller -behållarnas (1) temperatur, med hjälp av vilken man kan hålla polymerisationsbehållaren eller -behållarna vid optimal temperatur för polymerisering av nukleinsyror, samt av en reglerande värmeväxlare (12), som reglerar denaturationsbehållarens eller -behållarnas (2) temperatur, vid optimal temperatur för denaturering av nukleinsyror, samt av ett transportsystem för vätskor, med hjälp av vilket man kan överflytta reaktionsvätska från en behållare (1,2) till en annan längs ett eller flera rörledningar (3).

2. En apparat enligt patentkrav 1, k ä n n e t e c k n a d därav, att till vätsketransportsystemet hör gasledningar (5,6), som leder till behållarna (1,2) i paret eller paren av behållare samt ventiler (7,8) för reglering av gasflödet.

3. En apparat enligt patentkrav 1, k ä n n e t e c k n a d därav, att rörledningen (3) löper genom en särskild värmeväxlare (4).

4. En apparat enligt patentkrav 1, k ä n n e t e c k n a d därav, att den dessutom innehåller en doseringsapparat och -rörledning (9) för tillsats av reagens och/eller prov.

5. En apparat enligt patentkrav 2, k ä n n e t e c k n a d därav, att ventilerna (7,8) styrs av en mikroprocessor.

6. En apparat enligt patentkrav 2, k ä n n e t e c k n a d därav, att gasledningarna (5,6) är sammanfogade med gasfördelare (10), vilka är reglerade av ventilerna (7,8).

7. En apparat enligt patentkrav 1, k ä n n e t e c k n a d därav, att den rörledning (3), som förenar behållarna (1,2) räcks ända till behållarnas botten.

8. En apparat enligt patentkrav 1, k ä n n e t e c k n a d därav, att behållarnas (1,2) botten avsmalnar nedåt.

9. En apparat enligt patentkrav 4, k ä n n e t e c k n a d därav, att doseringsbehållaren för reagens fungerar fortlöpande.

10. En apparat enligt patentkrav 4, k ä n n e t e c k n a d därav, att doseringsbehållaren för reagens fungerar periodvis.

11. En del av en apparat enligt patentkrav 1 och 2, bestående av ett par av behållare (1,2) som sammanfogas med hjälp av en rörledning (3) samt till behållarna (1,2) ledande gasledningar (5,6), k ä n n e t e c k n a d därav, att apparatdelen är ämnad för engångsbruk.

12. Förfarande för mångfaldigande av nukleinsyror utfört med hjälp av en apparat enligt patentkrav 1, k ä n n e t e c k - n a t därav, att följande skeden utförs:

- a) en reaktionsblandning innehållande de för polymerisationsreaktionen behövliga reagensen samt enkelsträngad testnukleinsyra inkuberas
- b) dubbelsträngad nukleinsyra i reaktionsblandningen denatureras
- c) reaktionsblandningen avkyls
- d) vid behov tillförs DNA-polymeras

e) samma reaktionscykel upprepas ett behövligt antal gånger, så att skedena a) och b) utförs i skilda behållare (1,2), vilkas temperatur hela tiden hålls vid en för vardera skedet lämplig temperatur.

13. Förfarande enligt patentkrav 12, k ä n n e t e c k n a t därav, att den denaturerade nukleinsyran avkyls innan den överförs till den behållare där polymerisationen sker.

14. Förfarande enligt patentkrav 12, k ä n n e t e c k n a t därav, att reaktionslösningen överförs från en behållare till en annan med hjälp av gastryck.

15. Förfarande enligt patentkrav 12, k ä n n e t e c k n a t därav, att polymerasenzym tillförs kontinuerligt.

16. Förfarande enligt patentkrav 12, k ä n n e t e c k n a t därav, att polymerasenzym tillförs periodvis.

17. Förfarande enligt patentkrav 12, k ä n n e t e c k n a t därav, att reaktionsbehållaren innehåller immobiliserat polymerasenzym.

18. Förfarande enligt patentkrav 12, k ä n n e t e c k n a t därav, att reaktionsbehållaren innehåller polymerasenzym i retarderad doseringsform.

Viitejulkaisuja-Anförda publikationer

-

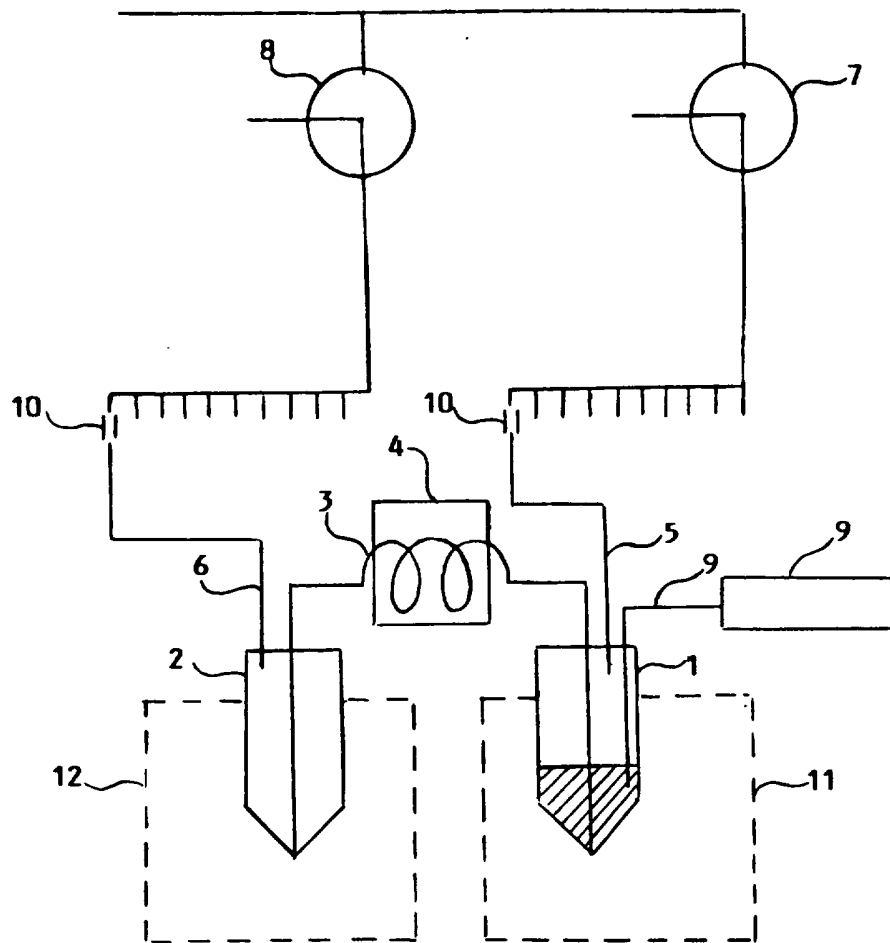


FIG. 1

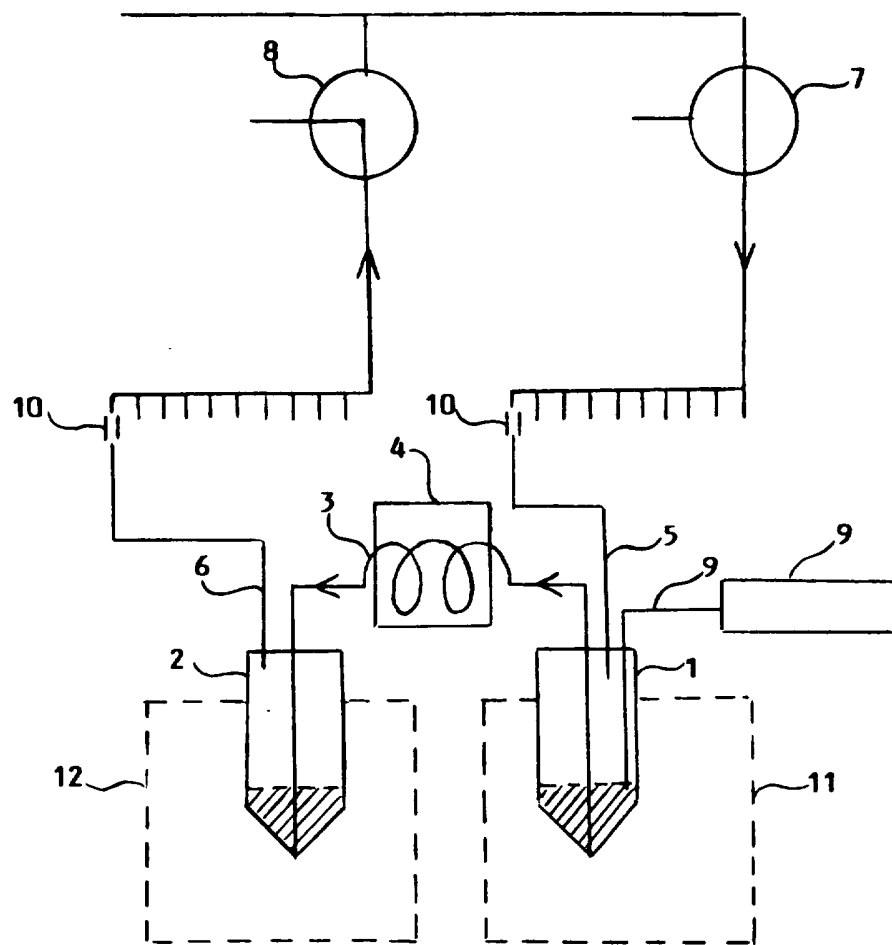


FIG. 2

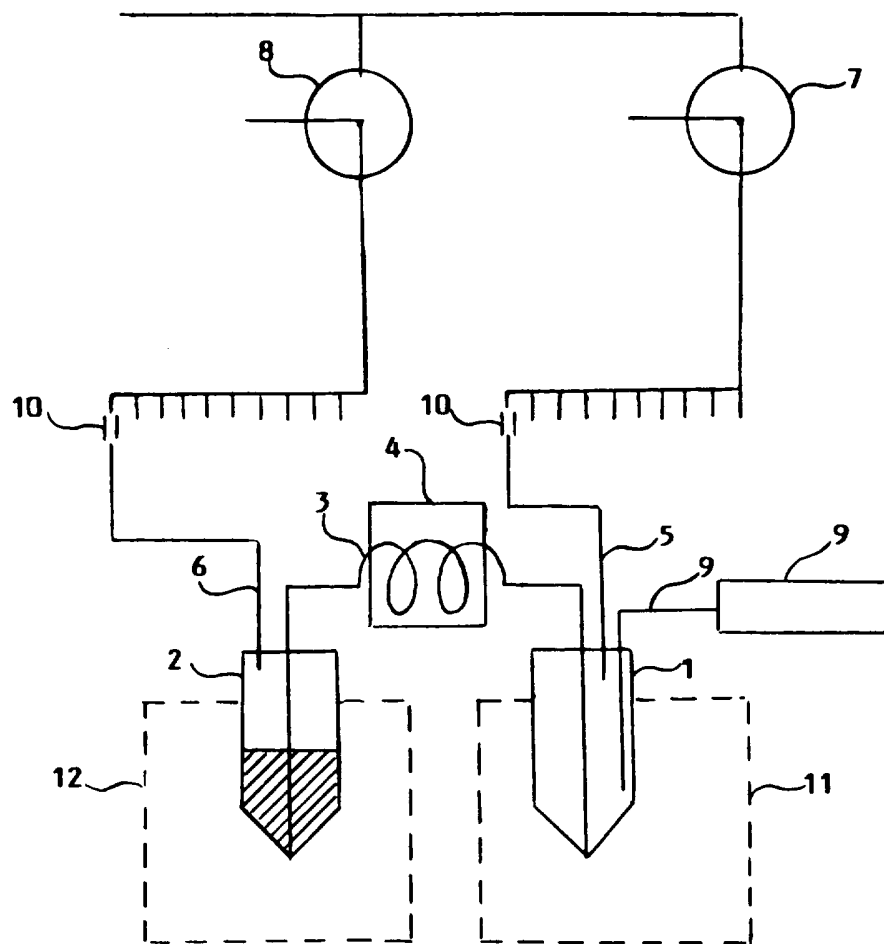


FIG. 3

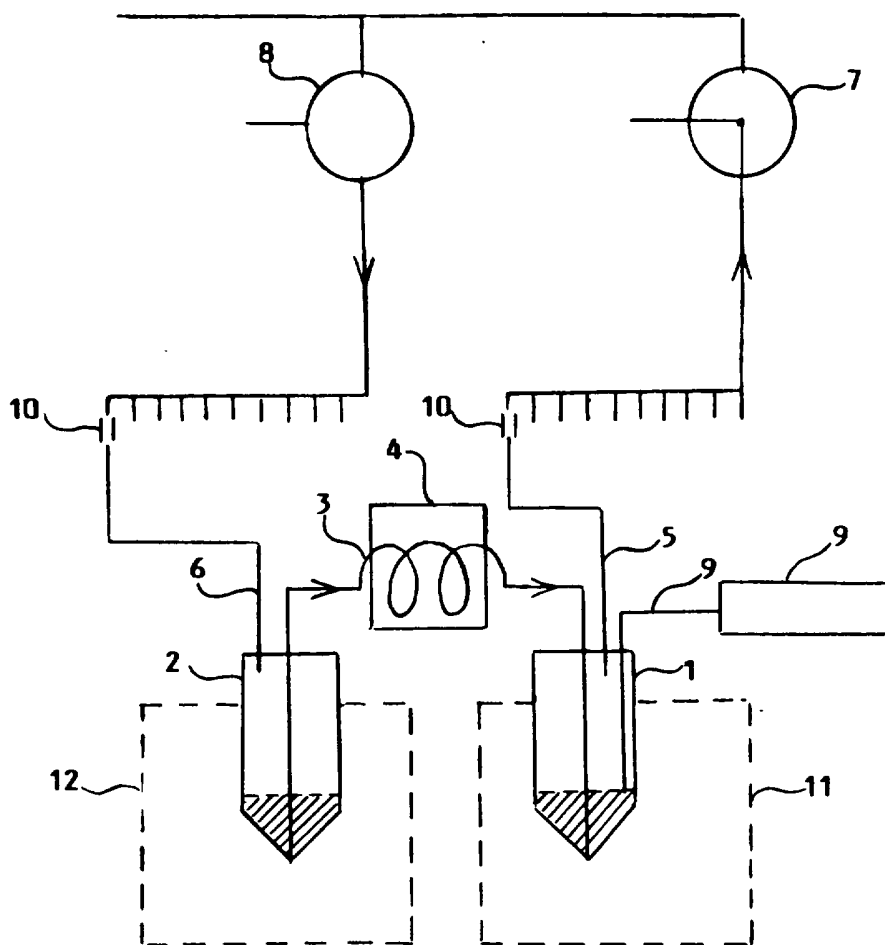


FIG. 4