

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

1999 - 2013

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **20.11.1997**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **06.12.1996 31.07.1997**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1996/9625442 1997/9716052**

(33) Země priority: **GB GB**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **12.01.2000**
(Věstník č. 1/2000)

(86) PCT číslo: **PCT/GB97/03187**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO98/24548**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

B 01 L 7/00

G 05 D 23/19

(71) Přihlašovatel:

THE SECRETARY OF STATE FOR DEFENCE,
Farnborough, GB;

(72) Původce:

Lee Martin Alan, Salisbury, GB;
Leslie Dario, Salisbury, GB;

(74) Zástupce:

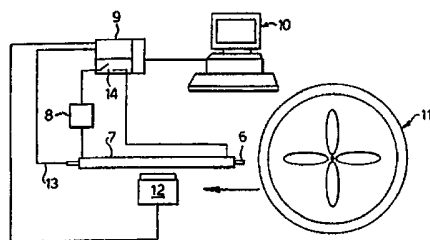
Čermák Karel Dr., Národní 32, Praha 1,
110 00;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Reakční nádoba

(57) Anotace:

Reakční nádoba obsahuje elektricky vodivý polymer /7/ schopný emitovat teplo. Řešení spočívá v tom, že reakční nádoba např. kapilární trubka /6/ je opatřena páskem z elektricky vodivého polymeru /7/. Ohřev je zajištěn elektrickým zdrojem /8/, který je přes převodník /9/ připojen k počítači /10/. Pro monitorování teploty je na vnější straně polymeru /7/ uspořádán infračervený termočlánek /12/. Zařízení je vhodné pro reakci s teplým cyklováním, např. polymerázové řetězové reakce.



23.07.99

PV 2013 - 99

Reakční nádoba

Oblast techniky

Předložený vynález se týká nádob a zařízení pro řízený ohřev reakčních látek, například při biochemických reakcích, a způsobů jejich využití.

Dosavadní stav techniky

Řízený ohřev reakčních nádob se často provádí za použití pevných blokových ohříváčů, které se ohřívají a chladí různými způsoby. Současné pevné blokové ohříváče se ohřívají a chladí, mezi jinými, elektrickými prvky nebo termoelektrickými zařízeními. Jiné reakční nádoby se mohou ohřívat halogenovými lampami nebo zařízeními na proudící vzduch. Nádoby se mohou chladit pomocí termoelektrických zařízení, kompresorovými chladicími technikami, vzduchem nebo chladicími médii. Reakční nádoba je připojena na blokový ohříváč s různým stupněm komfortu. Tak například tepelný kontakt mezi blokovým ohříváčem a reakční nádobou se mění od jedné konstrukce ohříváče ke druhé. V reakcích vyžadujících více reakčních stupňů se teplota blokového ohříváče může nastavovat pomocí programovatelného regulátoru, například pro umožnění provádění tepelných cyklů pomocí ohříváčů.

Tento typ uspořádání ohříváče je zvláště vhodný pro reakce vyžadující tepelné cyklování, například metody amplifikace DNA, jako polymerázová řetězcová reakce (PCR, Polymerase Chain Reaktion). PCR je postup pro vytváření

23.07.99

velkých množství zvláštních sekvencí DNA a je založena na charakteristikách párování bází DNA a přesném kopírování komplementárních vláken DNA. Typický postup PCR zahrnuje cyklus tří základních kroků.

Denaturace: Směs obsahující reakční činidla pro PCR (zahrnující kopírovanou DNA, jednotlivé nukleotidové báze (A,T,G,C), vhodné primery a enzym polymerázu) se zahřívá na předem stanovenou teplotu pro oddělení dvou vláken cílové DNA.

Ochlazení: Směs se poté chladí na předem stanovenou teplotu a primery (molekuly s krátkým vláknem, jejichž přítomnost je nutná pro tvoření molekul s delším řetězcem DNA) lokalizují jejich komplementární sekvence DNA a váží se k nim.

Růst: Směs se znovu zahřívá na stanovenou teplotu. Enzym polymeráza (fungující jako katalyzátor) připojuje jednotlivé nukleotidové báze na konec primeru pro vytvoření nového vlákna DNA, které je komplementární sekvenci cílové DNA, přičemž se obě vlákna vzájemně spojují.

Nevýhoda známých blokových ohříváčů spočívá v době zpoždění, nutné aby topný blok mohl ohřívat a chladit na teplotu požadovanou pro reakci. Doba pro ukončení každého reakčního cyklu je částečně určena, vedle rychlosti reakce, tepelnou dynamikou ohříváče. Pro reakce zahrnující více cyklů a více teplotních stupňů tato doba zpoždění značně ovlivňuje dobu potřebnou pro úplné zreagování. Tepelné cyklovače založené na takovýchto blokových ohříváčích zpravidla potřebují 2 hodiny pro provedení 30 úplných reakčních cyklů.

23.07.99

Pro četné aplikace PCR techniky je požadováno dokončit sekvenci cyklů v minimálním možném čase. Zejména například když vzduch nebo tekutiny nebo potraviny pro lidskou a zvířecí spotřebu jsou podezřelé z kontaminace, mohou rychlé diagnostické metody ušetřit značné náklady, ne-li zdraví nebo dokonce životy.

Alternativní tepelný cyklovač obsahuje množství kapilárních reakčních trubic zavěšených ve vzduchu. Ohřev a chlazení reakčních trubic se provádí pomocí halogenové lampy a prouděním vzduchu pomocí ventilátoru. Tepelná dynamika tohoto systému představuje značné zlepšení oproti tradiční konstrukci blokového ohříváče, protože ohřátý a ochlazený vzduch je veden napříč reakčním trubicím a je rychle dosaženo požadované teploty, přičemž ventilátor poskytuje homogenní tepelné prostředí a nucené chlazení. Za použití tohoto aparátu může být uskutečněno 30 reakčních cyklů během asi 15 minut.

Nevýhodou tohoto tepelného cyklovače je, že vzduchové chlazení a ohřívání není vhodné pro víceúčelový aparát, a zejména ne pro mobilní nebo přenosný aparát tohoto druhu.

Podstata vynálezu

Přihlašovatelé vyvinuli účinný systém rychlého ohřevu a chlazení reakčních činidel, který je použitelný zejména při reakcích s tepelným cyklováním.

Předložený vynález poskytuje reakční nádobu zahrnující elektricky vodivý polymer, který emituje teplo při průchodu

23.07.99

elektrického proudu.

Elektricky vodivé polymery jsou známy ze stavu techniky a lze je získat od Caliente Systems Inc. of Newark, USA. Jiné příklady takovýchto polymerů jsou popsány například v patentech US 5 106 540 a US 5 106 538. Vhodné vodivé polymery mohou poskytnout teploty až do 300 °C a jsou tedy dobře použitelné pro PCR procesy, kde je typické rozmezí teplot mezi 30 °C a 100 °C.

Výhoda vynálezu proti konvenčnímu blokovému ohřívači je odvozena ze skutečnosti, že polymery, které vedou elektrický proud se ohřívají rychle. Rychlost topení závisí na přesné povaze polymeru, rozměrech použitého polymeru a velikosti přiváděného proudu. S výhodou má polymer vysoký měrný odpor, například více než 1000 ohm.cm. Teplota polymeru může být snadno řízena řízením množství elektrického proudu procházejícího polymerem, což umožňuje udržovat jej na požadované teplotě po požadovanou dobu. Dále, rychlost přechodu mezi teplotami může být po kalibraci snadno řízena dodáváním vhodného elektrického proudu, například řízeným vhodným počítačovým programem.

Dále, ve srovnání s blokovým ohřívačem, vzhledem k malé tepelné hmotě polymeru, může být zajištěno také rychlé chlazení. Je-li však třeba, reakční nádoba může být podrobena umělému chlazení pro další zvýšení rychlosti chlazení.

Vhodné způsoby chlazení zahrnují nucené vzduchové chlazení, například pomocí ventilátorů, ponoření do ledové nebo vodní lázně atd.

23.07.99

Kromě toho, použití polymeru jako topného prvku v reakční nádobě zpravidla umožní učinit přístroj kompaktnějším než jsou stávající blokové ohřívače, což je užitečné při provádění chemických reakcí v polních podmínkách jako například pod širým nebem, na řece, v továrně nebo také v malé dílně.

Reakční nádoba může mít formu kontejneru, jako například skleněného, plastového nebo silikonového kontejneru, s elektricky vodivým polymerem uspořádaným v těsné blízkosti kontejneru. Podle jednoho vytvoření nádoby je polymer opatřen pouzdrém, které je upevněno kolem reakční nádoby, v tepelném kontaktu s nádobou. Pouzdro buď může být vytvořeno jako tvarovaný povlak, obalující reakční nádobu, nebo může být vytvořeno jako pás fólie, která může být obalena kolem reakční nádoby a opevněna.

Uspořádání polymerního pouzdra znamená, že je dosažitelný bezprostřední tepelný styk mezi pouzdrém a reakční nádobou. To zajišťuje, že nádoba rychle dosáhne požadované teploty bez obvyklé doby zdržení způsobené izolačním efektem vzduchové vrstvy mezi reakční nádobou a ohřívačem. Dále, polymerní pouzdro může být použito k úpravě zařízení za použití již dříve existujících reakčních nádob. Zejména pás flexibilní polymerní fólie může být obalen kolem reakční nádoby různých velikostí a tvarů.

Při použití pouzdra může být výhodné, když je perforováno nebo nějakým způsobem mřížkováno. To může zvýšit flexibilitu polymeru a také umožnit snadnější přístup chladicího média, jestliže není pro chlazení použit samotný polymer.

23.07.99

V dalším vytvoření je polymer vytvořen jako integrální část reakční nádoby. Reakční nádoba může být vytvořena z polymeru extruzí, lisovstřikem nebo obdobnými technikami. Reakční nádoba může být alternativně vyrobena za použití kompozitní konstrukce, ve které je vrstva vodivého polymeru vložena mezi vrstvy materiálu, z něhož je nádoba vyrobena, nebo v němž je vnitřní nebo vnější povrch reakční nádoby povlečen polymerem, nebo dále v němž je nádoba vytvořena v podstatě z polymeru povlečeného tenkým laminátem z PCR kompatibilního materiálu. Takovéto nádoby mohou být vytvořeny laminováním a/nebo nanášením, například technikami chemického nebo elektrochemického nanášení, známými ze stavu techniky.

Nádoby, které obsahují polymer jako integrální součást, mohou představovat zvlášť kompaktní konstrukce.

Jestliže je pro některé zvláštní reakce třeba několik reakčních nádob, mohou být elektrické kontakty umístěny tak, že ke všem reakčním nádobám nebo trubkám může být připojen jediný napájecí přívod. Reakční nádoby mohou být uspořádány v poli.

Alternativně může mít každá reakční nádoba nebo každá skupina reakčních nádob svůj vlastní topný profil daný nastavením přiváděného proudu do této nádoby nebo skupiny nádob. To poskytuje další a zvláště významnou výhodu reakčních nádob s polymerem podle vynálezu proti pevným blokovým ohřívačům nebo ohřívačům na vzduch v tom, že jednotlivé nádoby mohou být řízeny navzájem nezávisle s jejich vlastním tepelným profilem. To znamená, že pro provádění více PCR zkoušek zároveň je možné použít poměrně malý aparát, nehledě na to, že každá zkouška vyžaduje různou

23.07.99

pracovní teplotu. Například PCR zkoušky pro zjištění značného množství organismů ve vzorku se mohou provádět zároveň, nehledě na to, že sekvence nukleotidů, charakteristická pro každý organismus, se amplifikuje při jiné pracovní teplotě PCR.

Polymer může být vhodně vytvořen ve formě tabulového materiálu nebo fólie, například o tloušťce 0,01 mm až 10 mm, například 1 až 1 mm, s výhodou 0,1 až 0,3 mm. Za použití tenkých fólií je minimalizován objem polymeru potřebný pro pokrytí jednotlivé reakční nádoby nebo povrchu. To redukuje dobu potřebnou pro ohřátí polymeru na požadovanou teplotu, jestliže teplo vytvořené průchodem proudu skrze polymer nemusí být distribuováno skrze velký objem polymerního materiálu.

V provozu je polymerní součást reakční nádoby uspořádána tak, aby mohl být v polymeru vytvořen elektrický proud. Toho může být dosaženo opatřením polymeru kontakty pro elektrický přívod, nebo indukováním elektrického proudu uvnitř polymeru, například vystavením polymeru vhodnému elektrickému nebo magnetickému poli.

Spojení tepelného kontaktu mezi polymerem a kontejnerem s reakčním činidlem nebo činidly, které může být realizováno v reakčních nádobách podle vynálezu, redukuje nebo eliminuje izolační efekt vzduchové vrstvy mezi topným prvkem a reakční nádobou.

V jednom vytvoření vynálezu nádoba zahrnuje kapilární trubku. Přestup tepla z kapilární trubky do reakčních činidel v ní obsažených je rychlejší, než jakého je dosaženo za použití konvenčních reakčních nádob, neboť poměr plochy

23.07.99

povrchu k objemu reakčních činidel v kapilární trubce je větší, než v konvenční reakční nádobě.

Alternativně může nádoba zahrnovat plochou opěrnou desku, jako například dvourozměrné pole, zejména čip, například silikonový destičkový čip, nebo destičku, zejména mikroskopové sklíčko, na které jsou nesena reakční činidla. Deska může být vyrobena z polymeru, nebo může být polymer vytvořen jako integrální část desky, buď jako povlak na jedné straně desky nebo jako polymerní vrstva uvnitř kompozitní konstrukce jak bylo výše popsáno. Je-li třeba, a zejména jestliže je deskou čip, může být polymer nanášen a/nebo leptán v preferovaném formátu na čipu za použití například technologie tištěných obvodů (PCB, printed circuit board).

Nádoby tohoto typu mohou být zvláště užitečné pro provádění PCR *in situ*, například na vzorcích tkáně.

Jiné vhodné reakční nádoby jsou trubky a kyvety, známé v oboru.

Vynález dále poskytuje zařízení pro reakce vyžadující více teplotních stupňů, přičemž uvedné zařízení obsahuje reakční nádobu popsanou výše, prostředky pro vytváření elektrického proudu uvnitř polymeru a řídicí prostředky pro regulaci množství elektrického proudu procházejícího polymerem pro řízení jeho teploty.

Řídicí prostředky jsou s výhodou automatické řídicí prostředky, jako například počítačem řízené interfacové uspořádání. Za pomoci programovatelného ovladače pro elektrický obvod spojený s polymerem může být pomocí

23.07.99

zařízení předem naprogramován definovaný topný režim, například definovaný počet cyklů předem stanovených teplotních stupňů, které se mají realizovat po dobu předem stanovených časových intervalů a zdržení, včetně využití různých teplotních a časových profilů s různými reakčními nádobami v témže zařízení v téže době.

Řídící prostředky mohou zahrnovat zařízení pro monitorování teploty, například termočlánek, který monitoruje teplotu reakční nádoby a dodává tuto informaci do kontrolního systému pro dodržení požadovaného režimu topení a/nebo chlazení.

Alternativně může být teplota polymeru monitorována přímo měřením jeho měrného odporu, například uspořádáním polymerního topného prvku jako odporu v obvodu tvořícím Wheatstonův můstek. Tím odpadá použití jiných zařízení pro měření teploty, například termočláneků.

Volitelně může zařízení dále obsahovat prostředky pro nucené chlazení, například jeden nebo více ventilátorů.

Zařízení může obsahovat množství kontejnerů. Polymer může být vytvořen jako integrální část každého kontejneru, jako pouzdro kolem každého kontejneru nebo může být uspořádán tak, že je vrstva polymeru mezi sousedními kontejnery. Všchny elektrické kontakty na polymeru mohou být připojeny k jednomu elektrickému přívodu, jestliže se provádí více reakcí, které vyžadují stejné teplotní stupně.

Ve výhodném provedení však je zařízení uspořádáno tak, že polymer v kontaktu s kontejnerem nebo skupinou kontejnerů (nebo tvořící kontejner nebo skupinu kontejnerů) je připojen

23.07.99

k individuálnímu přívodu, přičemž několik kontejnerů nebo skupin kontejnerů je připojeno k různým, nezávisle řízeným elektrickým přívodům. S tímto uspořádáním se může současně provádět více různých reakcí vyžadujících různé teplotní stupně, protože každý kontejner nebo skupina kontejnerů má svůj vlastní topný prvek. Toto uspořádání umožňuje uživateli provádět množství reakcí s malými vsázkami za použití jediného zařízení, což za použití existujícího zařízení nebylo možné. Jediné dosavadní zařízení vhodné pro tento typ použití jsou určité konstrukce blokových ohříváčů, které mají mezi 2 a 4 segmenty, které mohou být ohřívány a chlazeny nezávisle. Toto zařízení je však omezeno na použití pro 2 až 4 reakční vsázky a má nevýhodu pomalého cyklu, jak bylo popsáno výše.

Když reakční nádoba obsahuje destičku nebo čip, může zařízení obsahovat destičku nebo čip, elektrický přívod, prostředky pro připojení elektrického přívodu k destičce nebo čipu nebo pro indukování elektrického proudu v polymeru a prostředky pro řízení proudu procházejícího vrstvou polymeru v destičce nebo čipu.

Reakční nádoby a zařízení podle vynálezu mohou být použity v různých situacích, kdy je požadováno provádění chemických nebo biochemických reakcí. Vynález tak dále poskytuje způsob provádění reakce, jako například chemické nebo biochemické reakce, kterýžto způsob zahrnuje ohřívání reakčních činidel v reakční nádobě uvedené výše.

Stejně jako pro amplifikační reakce, jako například již výše zmíněná PCR reakce, mohou být nádoby a zařízení podle vynálezu použity pro účely vytváření sekvence nukleové kyseliny a při kinetických studiích enzymů, při kterých se

23.07.99

studuje aktivita enzymů při různých teplotách, popřípadě jiných reakcí, zejména reakcí zahrnujících enzymatickou aktivitu, při kterých je třeba udržovat přesnou teplotu. Reakční nádoby podle vynálezu umožňují dosažení přesných teplot a jejich udržování po dobu vhodné časové periody, podle potřeby ji rychle změnit, a to i v mobilním nebo přenosném zařízení podle některých vytvoření vynálezu.

Pro PCR reakce se teplotní podmínky požadované pro dosažení denaturace, ochlazení nebo prodloužení, a doba potřebná pro provedení těchto stupňů, mění v závislosti na různých faktorech, jak je v oboru známo. Příklady těchto faktorů zahrnují povahu a délku nukleotidu, který se má amplifikovat. Příklady těchto faktorů zahrnují povahu a délku amplifikovaného nukleotidu, povahu použitých primerů enzymů. Optimální podmínky může určit pro každý případ odborník v oboru. Typické teploty denaturace jsou řádově 95 °C, typické teploty ochlazení jsou řádově 55 °C a teploty prodlužování 72 °C zpravidla řádově odpovídají. Při použití reakčních nádob a zařízení podle vynálezu mohou být tyto teploty rychle dosaženy a rychlost přechodu mezi teplotami snadno kontrolována.

V mnoha vytvořeních vynálezu lze samozřejmě použít zkoušek pomocí generických DNA srovnávacích barviv a zkušebních genových materiálů specifických pro vlákno, např. zkoušek Taqman^R popsaných v US patentu č. 5 538 848 a zkoušek materiálů TIRF (Total Internal Reflection Fluorescence) popsaných ve WO93/06241. Při těchto zkouškách se signál ze vzorku, například fluorescenční nebo evanescenční, detekuje pomocí zařízení pro monitorování fluorescence. Když se provádí tento typ procesu, musí být fluorescenční monitorovací zařízení uspořádáno tak, aby bylo

23.07.99

schopno detekovat signál vyzařující ze vzorku. V některých případech může být užitečné, jestliže je alespoň část nádoby, například v případě trubky podle vynálezu její konec, opticky čirá, aby bylo možno skrze ni provádět měření. Alternativně může nádoba být opatřena prostředky pro vedení signálu ze vzorku do monitorovacího zařízení, například optickým vláknem nebo evanescenčním vlnovodem.

Přehled obrázků na výkresech

Vytvoření předloženého vynálezu bude nyní popsáno za pomoci příkladu s odkazem na přiložené výkresy, na kterých

obr. 1 představuje ohřívač reakční nádoby zahrnující pozdro z elektricky vodivého polymeru uspořádaného pro upevnění kolem reakční trubky,

obr. 2 představuje reakční destičku mající na svém povrchu povlak elektricky vodivého polymeru,

obr. 3 představuje reakční destičku mající vrstvu elektricky vodivého polymeru uvnitř kompozitní konstrukce,

obr. 4 představuje zařízení pro provádění reakcí zahrnujících více teplotních stupňů, které využívá pásek elektricky vodivého polymeru pro ohřev kapilární trubky reakční nádoby,

obr. 5 představuje schema zařízení podle vynálezu pro provádění PCR reakce,

obr. 6 představuje termocyklační profil použitý

23.07.99

v zařízení podle obr. 5,

obr. 7 je schema přenosného PCR multidetektoru, a

obr. 7a je schema prvku detektoru pro použití v zařízení podle obr. 7.

Příklady provedení vynálezu

Podle obr. 1 je pouzdro z elektricky vodivého polymeru 2 opatřeno elektrickými kontakty 3 pro připojení k elektrickému zdroji. Velikost a tvar pouzdra 2 jsou dány rozměry a tvarem reakční nádoby 1, pro niž níž je pouzdro uzpůsobeno.

Při použití se pouzdro 2 umístí kolem reakční nádoby 1, s níž je v tepelném kontaktu. Kontakty 3 se pak připojí k elektrickému zdroji (neznázorněnému) a polymerním pouzdrem 2 prochází proud, čímž je ohřívá spolu s reakční směsí v reakční nádobě 1.

Podle obr. 2 je destička 1 povlečena na jedné straně elektricky vodivým polymerem 2. Elektrické kontakty 3 jsou uspořádány na jednom konci destičky 1 a jsou v elektrickém spojení s polymerní vrstvou 2.

Na obr. 3 obsahuje nádoba destičku 1 mající kompozitní konstrukci, ve které je vrstva elektricky vodivého polymeru 2 vložena mezi vrstvami obvyklého materiálu používaného pro výrobu takovýchto destiček, například skla. Elektrické kontakty 3 jsou uspořádány na jednom konci destičky 1, v elektrickém spojení s polymerní vrstvou 2.

23.07.99

Při použití se elektrický zdroj (neznázorněný) připojí k elektrickým kontaktům 3 na destičce znázorněné na obr. 2 a 3 a proud prochází skrze polymerní vrstvu 2, čímž se ohřívá destička 1 a reakční činidla umístěná na destičce 1.

Na obr. 4 je pásek z elektricky vodivého polymerního filmu 2 obalen kole kapilární trubice 1 a zajištěn. Pásek polymerního filmu 2 je opatřen elektrickými kontakty 3, na které je připojen elektrický zdroj 5 prostřednictvím spojovacích svorek 4.

Při použití proud prochází skrze polymerní film 2, čímž ohřívá kapilární trubku 1 a reakční činidla umístěná uvnitř kapilární trubky 1.

Zařízení podle obr. 5 bylo zkonstruováno pro provádění zjišťování PCR. Jako reakční nádoba byla použita kapilární trubka s vnitřním průměrem 1,12 mm a vnějším průměrem 1,47 mm. Pásek z elektricky vodivého polymeru 7 byl obalen kolem trubky a zajištěn tak, aby byl přidržován těsně k vnějšímu povrchu trubky. Ohřev se tak provádí ze všech stran trubky 6, čímž se minimalizuje teplotní gradient napříč vzorkem v trubce 6.

Ohřev byl zajištěn prostřednictvím elektrického zdroje 8, který byl prostřednictvím interface 9 připojen k počítači 10 pro umožnění automatického řízení topných cyklů. Ventilátorový chladič 11 byl uspořádán pro vedení vzduchu na polymer 7. Pro monitorování teploty byl na vnější straně polymeru 7 uspořádán infračervený termočlánek 12.

Pro účely stanovení výkonu zařízení před použitím byl

pro monitorování teploty uvnitř trubky 6 použit termočlánek typu K. Vnitřní a vnější teploty pak byly použity pro lineární přepočet vnější teploty na teplotu vzorku.

Topný polymer je připojen na zdroj 8 energie a obvod je uzavřen pomocí interface 9 a softwaru. Vypínač 14 uspořádaný pro spojení obvodu bylo rychlé optické relé, které může spínat každých 10 ms. Druhý elektrický obvod byl použit pro řízení dvou malých elektrických ventilátorů 11, zajišťujících nucené vzduchové chlazení reakčního vzorku, které mohou pracovat nepřetržitě. Řídící software byl LabView, který poskytuje uživatelsky přátelský grafický interface pro programování i provoz. Proud byl přiváděn zpočátku s poměrně vysokou frekvencí pro rychlejší dosažení požadované teploty. Po dosažení stanovené pracovní teploty byl proud přiváděn s menší frekvencí, než je požadována pro udržování stanovené provozní teploty po předepsanou dobu.

Zařízení znázorněné na obr. 7 zahrnuje zavírací krabici 70 mající rozdělení vymezující množství receptorových okének 71 detektorových prvků. Krabice 71 je znázorněna elektricky připojená prostřednictvím interface 72 ke zdroji 73 energie a počítači 74. Připojení je takové, že umožňuje rozdílné napájení každého okénka 71. Každé okénko obsahuje termočlánek (neznázorněný) pro monitorování teploty uvnitř něho.

Detektorový prvek znázorněný na obr. 7a zahrnuje reakční trubku 75 obklopenou pouzdrem 76. Pouzdro 76 je vytvořeno z topného polymeru a je připojeno k napájecím koncovkám 77 a 78.

Po naplnění a uzavření trubky 75 byla zasunuta do

23.07.99

vhodného okénka 71 až do zaklapnutí koncovek 77 a 78 na příslušných koncovkách v okénku (neznázorněno). Zapojené zařízení je upraveno pro ukazování stavu zapojení každé trubky 75 na obrazovce počítače.

Uzavřením víčka krabice 70 je provedena izolace každého okénka a zachycení každé trubky 75 v jejím okénku.

Počítačový program je upraven pro oddělenou identifikaci hledané molekuly pro každou trubku 75, což je realizováno tak, že je upraven pro řízení vhodného teplotního cyklu PCR pro amplifikaci této molekuly, je-li přítomna. Když je tento cyklus ukončen, může být obsah trubky vystaven vhodnému genovému testovacímu detektoru pro určení, zda je hledaná molekula skutečně přítomna.

Princip zařízení, popsaného s ohledem na obr. 7 a 7a, samozřejmě může být realizován různými způsoby. Může být spíše mobilní než přenosný, a může být uspořádán pro přijetí detektorových prvků v jiné formě než ve formě trubky například ve formě destičky. Zpravidla je uspořádán pro zpracování 96 nebo 192 detektorových prvků.

Vynález ilustruje následující příklad.

Příklad

Amplifikace DNA

Za použití přístroje podle obr. 5 s odstraněným termočlánkem typu K byla prováděna následující PCR reakce.

Byl amplifikován amplikon se 100 dvojicemi bází

23.07.99

z klonovaného fragmentu *Yersinia pestis*. Reakční podmínky byly předem optimalizovány pomocí Idaho RapidCyclerTM a vzorky stejné reakční směsi byly amplifikovány v Idaho RapidCyclerTM jako kontrolní reakce.

Reakční směs umístěná v trubce 6 obsahovala:

50 mM Tris.HCl pH 8,3

3 mM MgCl₂

2,5 mg/ml albumenu hovězího séra

vždy 200 µg/ml dATP, dTTP, dCTP a dGTP

vždy 10 µg/ml PCR primeru

25 jednotek/ml Taq polymerázy.

Termocyklační profil byl naprogramován na 95 °C po dobu nula sekund, 55 °C po dobu nula sekund, 72 °C po dobu nula sekund, jak je ilustrováno na obr. 6. Pro srovnání byl obdobný termocyklační profil naprogramován do Idaho RapidCyclerTM. Jak v polymerem pokryté kapilární nádobě 6, tak v RapidCyclerTM byl použit reakční objem 50 µl.

V této souvislosti znamená "po dobu nula sekund" skutečnost, že jakmile je dosaženo cílové teploty, program velí k zavedení následující teploty. Přesná doba, po kterou se reakce udržuje na cílové teplotě je nicméně závislá na parametrech a vlastnostech použitého zařízení. Obecně však bude menší než jedna sekunda.

Po 40 cyklech v kapilární nádobě byl 50µl vzorek PCR produktu z každé reakce frakcionován podle velikosti elektroforézou na agaróze ve 2% gelu v 1 x TAE pufru. DNA byla zviditelněna obarvením pomocí bromidu ethidu. Vzorek byl veden v sousedství vzorku z Idaho RapidCyclerTM (25 cyklů) a byl nalezen obdobně správně velký ampikon.

UPRAVENÉ STRANY

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Zařízení pro provádění reakcí, které obsahuje množství reakčních nádob pro pojmутí reakčních činidel, elektricky vodivý polymer, který emituje teplo když jím prochází elektrický proud, a řídící prostředky pro řízení přívodu proudu do polymeru, přičemž polymer je připojitelný k elektrickému přívodu prostřednictvím řídících prostředků.

2. Zařízení podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že pro ohřev každé nádoby nebo skupiny nádob může být přiváděn různý proud.

3. Zařízení podle nároku 2, **vyznačující se tím**, že je opatřeno řídícími prostředky pro přivádění proudu pro různé teplotní a/nebo časové profily pro každou z reakčních nádob.

4. Zařízení podle některého z nároků 1 až 3, **vyznačující se tím**, že každá reakční nádoba zahrnuje kontejner pro reakční činidla a ohřívací polymer je ve styku s uvedeným kontejnerem.

5. Zařízení podle nároku 4, **vyznačující se tím**, že ohřívací polymer tvoří pouzdro kolem kontejneru.

6. Zařízení podle nároku 4 nebo 5, **vyznačující se tím**, že ohřívací polymer ve formě fólie.

7. Zařízení podle nároku 5 nebo 6, **vyznačující se**

23.07.99

tím, že pouzdro je integrální s kontejnerem.

8. Zařízení podle některého z nároků 4 až 7, **vyznačující se tím**, že ohřívací polymer je perforovaný nebo mřížkovaný.

9. Zařízení podle některého z nároků 1 až 3, **vyznačující se tím**, že ohřívací polymer tvoří kontejner pro reakční činidla.

10. Zařízení podle některého z nároků 1 až 3, **vyznačující se tím**, že reakční nádoba zahrnuje kontejner pro reakční činidla, přičemž uvedeným ohřívacím polymerem je povlečen jeden z povrchů kontejneru.

11. Zařízení podle některého z předcházejících nároků, **vyznačující se tím**, že každá reakční nádoba zahrnuje kapilární trubku.

12. Zařízení a reakční nádoba podle některého z nároků 1 až 10, **vyznačující se tím**, že reakční nádoba zahrnuje destičku.

13. Zařízení podle některého z nároků 1 až 10, **vyznačující se tím**, že reakční nádoba zahrnuje čip.

14. Zařízení podle některého z předcházejících nároků, **vyznačující se tím**, že reakční nádoby jsou uspořádány v poli.

15. Zařízení podle některého z předcházejících nároků, **vyznačující se tím**, že řídicí prostředky jsou uspořádány pro přivádění elektrického proudu pro provádění

23.07.99

reakcí vyžadujících více teplotních stupňů v reakčních nádobách.

16. Zařízení podle nároku 15, **vyznačující se tím**, že řídicí prostředky jsou naprogramovány pro automatické provádění vícenásobných cyklů reakce.

17. Zařízení podle nároku 15 nebo 16, **vyznačující se tím**, že řídicí prostředky jsou uspořádány pro přivádění proudu podle předem stanoveného časového/teplotního profilu.

18. Zařízení podle některého z nároků 15 až 17, upravené pro procesy polymerázových řetězcových reakcí.

19. Zařízení podle některého z předcházejících nároků zahrnující dále prostředky pro detekci signálu ze vzorku v reakční nádobě.

20. Způsob provádění chemické nebo biochemické reakce, která vyžaduje více teplotních stupňů, zahrnující umístění reakčních činidel potřebných pro uvedenou reakci do reakční nádoby, která zahrnuje elektricky vodivý polymer který emituje teplo když jím prochází elektrický proud, přivádění proudu do uvedeného polymeru pro ohřátí reakčních činidel na první požadovanou teplotu, a následné nastavení proudu pro vytvoření následných teplotních stupňů potřebných pro reakci.

21. Způsob podle nároku 20, **vyznačující se tím**, že reakce je amplifikace DNA.

22. Způsob podle nároku 21, **vyznačující se tím**, že amplifikace je polymerázová polymerázová řetězcová reakce

23.07.99

(PCR).

23. Způsob podle některého z nároků 19 až 22, **vyznačující se tím**, že se reakční činidla umístí do reakčních nádob a ohřívají se zároveň.

24. Způsob podle nároku 23, **vyznačující se tím**, že každá reakční nádoba se ohřívá individuálně na teplotu potřebnou pro reakci probíhající v této nádobě.

25. Reakční nádoba zahrnující destičku nebo čip a elektricky vodivý polymer, který emituje teplo když jím prochází elektrický proud, přičemž uvedený polymer je uspořádán pro ohřev reakčních činidel na uvedené destičce nebo čipu.

26. Reakční nádoba podle nároku 25, **vyznačující se tím**, že uvedený polymer je integrální s destičkou nebo čipem.

27. Zařízení pro reakce vyžadující mnoho teplotních stupňů, podle nároku 1 a v podstatě jak je zde popsáno s odkazem na připojené výkresy.

28. Reakční nádoba zahrnující kontejner a elektricky vodivý polymer, upravený pro použití v zařízení podle některého z nároků 1 až 19.

Fig.1.

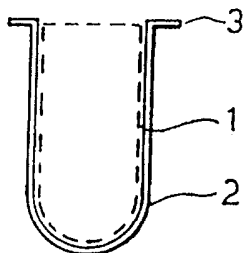


Fig.2.

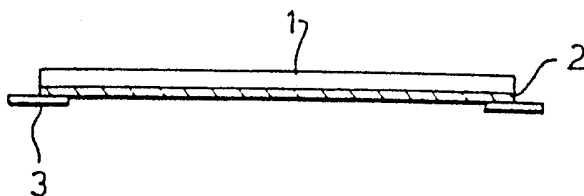
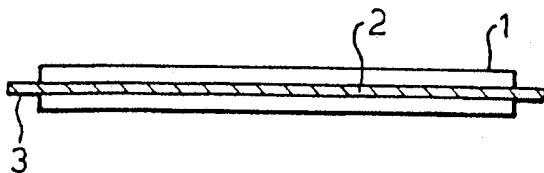


Fig.3.



200799

PCT/GB97/03187

PV 2013 - 99

Fig.4.

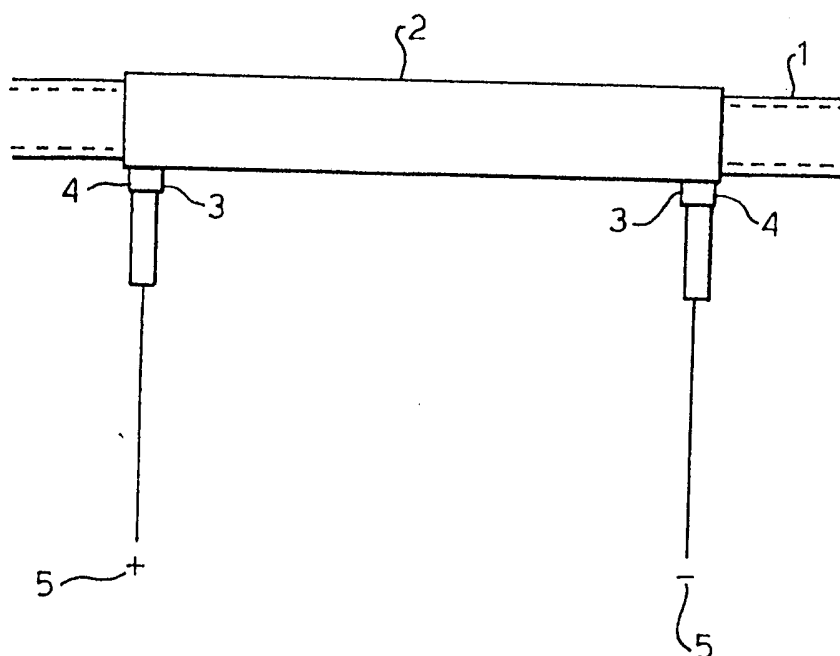


Fig.5.

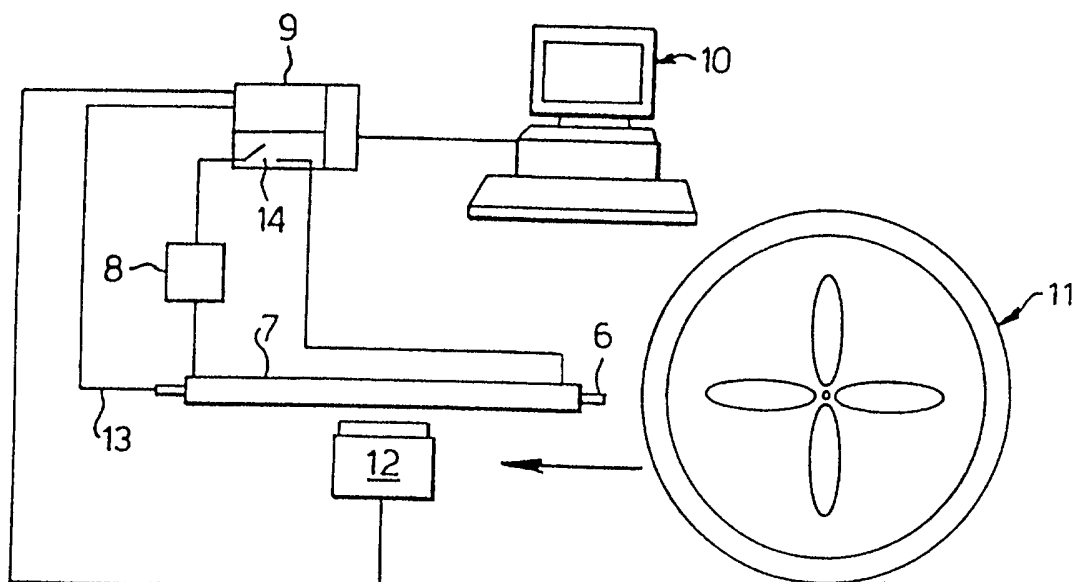


Fig.6.

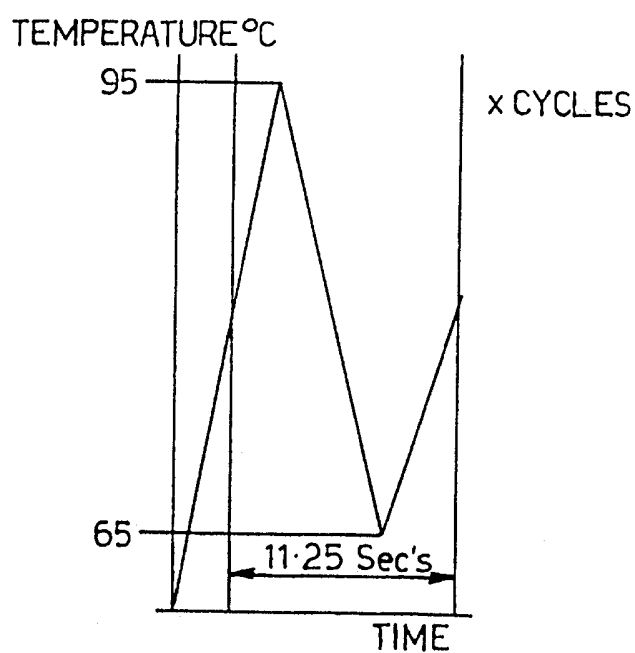


Fig.7.

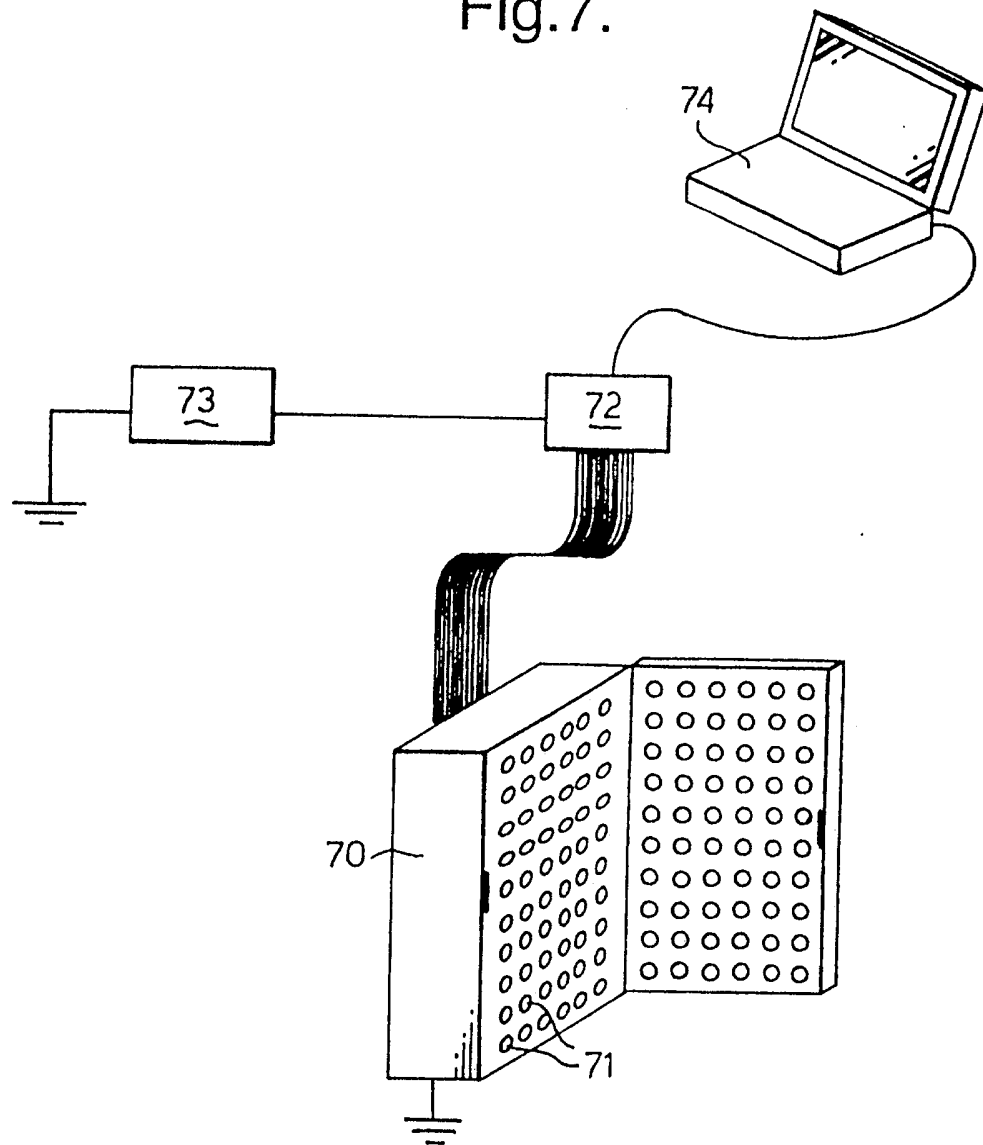


Fig.7a.

