(19) **RU** (11) **2 082 754** (13) **C1**

(51) МПК[6] **C 12 M 1/00**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(21), (22) Заявка: **92016293/13 , 15.05.1991**

(30) Приоритет: **16.05.1990 SE 9001772-4**

(46) Дата публикации: **27.06.1997**

(56) Ссылки: **Патент Великобритании N 733893, кл. C 12M 1/24, 1955.**

(86) Заявка PCT:
SE 91/00343 (15.05.91)

(71) Заявитель:
Матс Малмквист[SE]

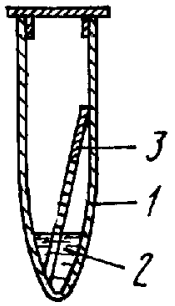
(72) Изобретатель: **Матс Малмквист[SE]**

(73) Патентообладатель:
Матс Малмквист[SE]

(54) СПОСОБ ПРОВЕДЕНИЯ БИОХИМИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ И УСТРОЙСТВО ДЛЯ ЕГО ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

(57) Реферат:

Использование: изобретение относится к области биохимии, в частности, к проведению всех типов стандартных биохимических реакций и диагностических анализов, при которых реагенты не могут быть смешаны заранее. Сущность изобретения: устройство содержит реакционный сосуд и капилляр, в котором размещен набор реагентов, разделенный промежутками. Реагенты могут быть заморожены. Перед началом проведения биохимической реакции капилляр помещают в реакционный сосуд, после чего содержимое центрифугируют, направляя на дно реакционного сосуда. К реагентам добавляют пробу. 2 с. и 10 з.п. ф-лы, 5 ил.



Фиг.1

RU 2082754 C1

RU 2082754 C1

(19) **RU** (11) **2 082 754** (13) **C1**

(51) Int. Cl.[6] **C 12 M 1/00**

RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21), (22) Application: 92016293/13 , 15.05.1991

(30) Priority: 16.05.1990 SE 9001772-4

(46) Date of publication: 27.06.1997

(86) PCT application:
SE 91/00343 (15.05.91)

(71) Applicant:
Mats Malmkvist[SE]

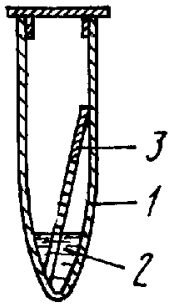
(72) Inventor: **Mats Malmkvist[SE]**

(73) Proprietor:
Mats Malmkvist[SE]

(54) METHOD AND DEVICE FOR CARRYING OUT BIOCHEMICAL REACTIONS

(57) Abstract:

FIELD: biochemical reactions. SUBSTANCE: inventions covers all types of standard biochemical reactions and diagnostic assays in which reagents cannot be mixed at advance. Device contains reaction vessel and capillary in which a set of spaced from each other reagents is placed. Reagent may be frozen. Before carrying out biochemical reaction, capillary is inserted into reaction vessel and its content is centrifuged directing toward the bottom of reaction vessel. Thereafter, a sample is added. EFFECT: simplified procedure. 11 cl, 5 dwg



Фиг.1

RU 2082754 C1

RU 2082754 C1

Изобретение касается способа проведения биохимических реакций, а также комбинации из капилляра и реакционного сосуда, используемой при осуществлении указанного способа.

Изобретение применимо для всех биохимических реакций малого объема, реагенты которых не могут быть смешаны заранее. В частности изобретение предназначается для ПЦР-метода (полимеразной цепной реакции).

Недавно разработанный ПЦР-метод привел к большим достижениям в ряде важных областей диагностики, например, при диагностике многих различных заболеваний, определении родителей, в судебной медицине и так далее. При определении РНК необходимой предварительной стадией является перевод РНК в ДНК с помощью ферментов обратной транскриптазы. Диагностика СПИДа обычно проводится по выявлению антител на ВИЧ-вирус в крови с помощью ELISA-теста (твердофазного иммуноферментного анализа). Однако человек может иметь ВИЧ-вирус и при отсутствии антител, например когда он находится на ранних стадиях заболеваний. В этом случае ELISA-тест даст отрицательный ответ и человек рискует невольно передать инфекцию другим. Поэтому потребность в более совершенном, т.е. более чувствительном, тесте на ВИЧ очень велика, диагностика других вирусов, культивирование которых раньше занимало много времени, также улучшается при использовании метода ПЦР.

Как практическая процедура ПЦР-диагностика включает в себя три стадии:

1. приготовление реакционной смеси, т.е. приготовление проб для тестирования;

2. быстрая амплификация, т.е. цепная реакция, в ходе которой молекулы ДНК реплицируются экспоненциально;

3. определение положительных проб с помощью электрофореза или гибридизации.

Недостатком ПЦР-метода, устранение которого является целью настоящего изобретения, является то, что первая стадия требует больших затрат времени и труда, главным образом из-за того что реагенты не могут быть смешаны заранее, и тем самым порождают много источников возникновения ошибок. Очень важно, чтобы первая стадия проводилась с большой точностью и аккуратностью, так как амплификации на второй стадии и результат анализа проб на второй стадии полностью зависят от правильного проведения первой стадии.

В ходе разных стадий приготовления реагентов для биохимических реакций, подобных вышеупомянутых ПЦР, существует опасность взаимного загрязнения между разными реакционными сосудами и пробирками.

При подготовке реакции ПЦР существует опасность так называемого "загрязнения переносом", т.е. загрязнения со стороны человека, который работает с пробой. Это особенно касается обычного анализа для определения специфичной ДНК, если один и тот же человек проводит все стадии перед ПЦР и работает с продуктами ПЦР. На коже, волосах и лабораторной одежде могут быть остатки ПЦР-продуктов предыдущих амплификаций, которые приводят к ложному положительному ответу. Опасность ложного положительного результата возрастает с увеличением чувствительности теста. Тест на ВИЧ очень чувствителен, а ложный положительный результат причиняет ненужные страдания соответствующему человеку.

Цель изобретения снижение опасности загрязнения, а также затрат времени на приготовление небольших объемов реагентов для определенных биохимических реакций, при которых реагенты не могут быть смешаны заранее и приготовление их требует времени.

Цель достигается с помощью способа, предусматривающего использование комбинации капилляра и реакционного сосуда соответственно по п. 1 и 6 формулы изобретения.

Описан капилляр [1] который содержит различные реагенты, разделенные гидрофобной жидкостью, например парафинами, маслами или алканами. В этом капилляре осуществляют как хранение реагентов, так и реакцию с пробой. Пробу добавляют в капилляр, после чего один его конец запаивают. Пробу перемешивают с реагентами с помощью стальной шпильки, которую опускают в капилляр, и магнита, который перемещают вверх и вниз вдоль внешней стороны капилляра. После соответствующего инкубационного периода капилляр центрифугируют для разделения реакционной смеси и гидрофобной жидкости на две отдельные фазы. Для анализа реакционной смеси капилляр нужно разрезать у запаянного конца, а также по границе между гидрофобной жидкостью и реакционной смесью, после чего реакционную смесь переносят в кювету или аналогичное устройство для измерения, например, поглощения ультрафиолетового излучения.

Такой известный капилляр решает проблему приготовления реагентов, которые не могут быть смешаны заранее. Однако из-за наличия упомянутых выше стадий обработки при этом не достигаются ни экономия времени, ни уменьшение загрязнения по сравнению с обычным способом при котором используются пипетки.

На фиг. 1 представлено схематичное изображение реакционного сосуда, содержащего капилляр с реагентами; на фиг. 2 схематичное изобретение другого варианта выполнения реакционного сосуда и капилляра с реагентами; на фиг. 3 изображен вид в плане сверху устройства на фиг. 2; на фиг. 4 капилляр с реагентами по фиг. 1 в более крупном масштабе; на фиг. 5 капилляр с реагентами по фиг.2 в более крупном масштабе.

Фиг. 1 изображает готовый к употреблению реакционный сосуд 1, выполненный согласно изобретению. Внутри реакционного сосуда 1, например пробирки Эппендорфа, помещен капилляр 3 с реагентами. Капилляр 3 заполнен различными реагентами любого типа, соответствующими требуемой реакции. На дне реакционного сосуда 1 может находиться вода или буфер 2 для последующего разбавления реагентов.

Фиг. 2 изображает другой вариант выполнения реакционного сосуда 1 и капилляра 3. Реакционный сосуд 1 снабжен крышкой 4 с отверстием 4а. Отверстие 4а закрыто проницаемой мембраной 4в.

RU 2082754 C1

RU 2082754 C1

Отверстие 4а, закрытое мембраной, в изображенном варианте находится в центре крышки 4, однако это не обязательно. Крышка может иметь несколько отверстий для установки несколько капилляров. Края отверстия 4а образуют фиксирующий воротник для капилляра 3, как показано на фиг. 5, которая более подробно будет описана ниже.

Капилляр 3, изображенный на фиг. 4, выполнен с возможностью введения в реакционный сосуд 1, показанный на фиг. 1. Капилляр 3 заполнен разными реагентами 6-13 для определенной биохимической реакции. Количество каждого реагента определено путем расчетов и соответствует только этой определенной реакции. Если должна проводиться реакция ПЦР, растворы реагентов включают в себя ПЦР-буфер, дЦТФ, дГТФ, дАТФ, дТТФ, два или более олигонуклеотида (все реагенты рассчитываются для определенной ПЦР реакции) и термостабильную ДНК-полимеразу. Между реагентами находится воздух или инертная жидкость. Порядок взаимного расположения реагентов может, конечно, выбираться разным.

Другой вариант выполнения капилляра изображен на фиг. 5. Этот капилляр выполнен с возможностью введения в реакционный сосуд, показанный на фиг. 2. Этот капилляр отличается от изображенного на фиг. 4 тем, что имеет в нижней части кольцевой фиксирующий паз 5, в который могут входить края отверстия 4а. Кроме того, верхний конец капилляра закрыт защитной крышкой 15. Реакционный сосуд показанный на фиг. 2, и капилляр, показанный на фиг. 5, до их использования хранятся отдельно. При использовании нижний конец капилляра 3 проталкивают через проницаемую мембрану 4в крышки 4 реакционного сосуда 1, пока в фиксирующий паз 5 не пойдет взаимодействующий с ним воротничок, образованный краями отверстия 4а. Защитная крышка 15 предохраняет содержимое капилляра 3 от загрязнения во время его введения и проталкивания в реакционный сосуд 1. После того как раствора реагентов в капилляре 3 растаяли, их подвергают центрифугированию, направляя вниз и смешивая друг с другом, а при необходимости и с растворителем 2 на дне сосуда 1. После центрифугирования крышка 4 может быть открыта без удаления капилляра 3. Это позволяет при необходимости добавлять материал в реакционный сосуд или извлекать его оттуда.

После приготовления капилляров с реагентами, например, путем отсасывания разных реагентов с воздухом или инертной жидкостью между ними вручную или автоматически они могут быть упакованы отдельно пли помещены в реакционный сосуд в виде наборов для проведения специфических биохимических реакций. Такая упаковка должна, конечно, проводиться в стерильных условиях.

Другой способ приготовления капилляров может включать отсасывание реагентов в капилляры с воздухом или инертной жидкостью между ними, замораживание капилляров, разрезание капилляров в местах нахождения воздуха и помещения нужных частей капилляров в один общий внешний капилляр, внутренний диаметр которого соответствует внешнему диаметру частей капилляров. Это позволяет получать любые необходимые комбинации реагентов.

Капилляры с реагентами вместе с реакционными сосудами или без них хранят в замороженном состоянии до их использования. Для использования капилляр с реагентами размораживают и затем центрифугируют его содержимое в реакционном сосуде, направляя его вниз и смешивая реагенты друг с другом и при необходимости с растворителем. Если проводится реакция ПЦР, все реагенты, включая термостабильную ДНК-полимеразу уже находятся в реакционном сосуде, и единственное, что требуется добавить перед амплификацией, это пробу, например кровь.

Лучше, если пробы добавляют с помощью дозирующей системы [2] При этом проба отсасывается в капилляр того же типа, что и капилляр 3, благодаря капиллярному эффекту. После этого капилляр с пробой вставляют в свободное отверстие 4а в крышке 4 реакционного сосуда 1, который затем повторно центрифугируют.

Для быстрого определения результатов реакции амплификации предлагается использовать для реакционных сосудов материал, который не поглощает или незначительно поглощает ультрафиолетовое излучение. Если после реакции добавить бромистый этидий, это позволит затем определить амплифицировалась ли ДНК путем осмотра сосудов невооруженным глазом при освещении их ультрафиолетовыми лучами. Предпочтительнее бромистый этидий добавлять тем же способом, что и пробу.

Необходимо учитывать, что капилляры с реагентами готовятся для определенного объема пробы и определенной биохимической реакции. Другие реакции требуют других объемов и количество реагентов.

Изобретение позволяет устранить многие операции, такие как использование пипеток, смена наконечников на пипетке, смена перчаток и повторное открывание и закрывание реакционного сосуда. Тем самым количество источников возникновения ошибок значительно уменьшается и тесты оказываются более достоверными, быстрыми и дешевыми. Вероятность ложного положительного результата ПЦР благодаря этому заметно уменьшается.

Таким образом, изобретение позволяет использовать в биотехнологии новый тип набора для проведения реакций, а именно полный набор, содержащий реагенты для определения реакции. В настоящее время на рынке имеется большое количество подобных наборов; обычно они состоят из пробирок Эппендорфа, содержащих различные реагенты примерно на 100 стандартных реакций. Для каждой реакции из каждой пробирки используют для смешивания определенный объем. Благодаря капиллярам с реагентами один набор может содержать, например, 500 капилляров, каждый из которых готов к использованию в реакции, для которой он предназначен. Преимущество наборов на основе капилляров с реагентами, описанных в данной заявке, состоит в том, что пользователь не капает реагенты из пипетки,

RU 2082754 C1

RU 2082754 C1

а вместо этого может выбрать соответствующий капилляр с реагентами для требуемой реакции пальцами или пинцетом. Упрощение работы в этом случае очевидно, особенно при работе с радиоактивными реагентами, так как исчезает опасность загрязнения пипеток, снижается опасность радиоактивных отходов и укорачивается время облучения персонала. Кроме того, помимо экономии средств и удобства использования капилляров с реагентами при проведении ПЦР, они также позволяют уменьшить затраты времени и улучшить защиту персонала при использовании во многих других областях биотехнологии.

Литература

1. Публикация заявки ГДР N225788.
2. Патентная зачвка Швеции N 910726-0.

Формула изобретения:

1. Способ проведения биохимических реакций, реагенты которых не могут быть смешаны заранее, с использованием капилляра, заполненного реагентами, отделенными друг от друга, отличающийся тем, что капилляр вставляют в первое отверстие в крышке реакционного сосуда, реакционный сосуд со вставленным капилляром центрифугируют для сбора содержимого капилляра на дне реакционного сосуда, а пробу, предназначенную для участия в реакции, добавляют в реакционный сосуд.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что капилляр, содержащий пробу, вставляют во второе отверстие в крышке реакционного сосуда и осуществляют второе центрифугирование.

3. Способ по пп.1 и 2, отличающийся тем, что растворы реагентов замораживают, а перед центрифугированием размораживают.

4. Способ по пп.1 3, отличающийся тем, что верхний конец капилляра с реагентами закрывают защитной крышкой перед тем, как нижний его конец вставляют в отверстие.

5. Способ по пп.1 4, отличающийся тем, что нижний конец капилляра вводят в реакционный сосуд до тех пор, пока края отверстия не войдут в фиксирующий паз на капилляре.

6. Устройство для проведения биохимических реакций, содержащее капилляр с реагентами и реакционный сосуд, отличающееся тем, что капилляр содержит растворы разных реагентов заранее определенных объемов, отделенных друг от друга воздухом или инертной жидкостью, а реакционный сосуд имеет крышку с одним или более отверстиями, при этом капилляр выполнен с возможностью введения его в отверстие в крышке реакционного сосуда при использовании.

7. Устройство по п.6, отличающееся тем, что капилляр снабжен фиксирующим пазом на нижнем конце.

8. Устройство по п.6 или 7, отличающееся тем, что капилляр снабжен защитной крышкой на верхнем конце.

9. Устройство по пп.6 8, отличающееся тем, что отверстие закрыто проницаемой мембраной.

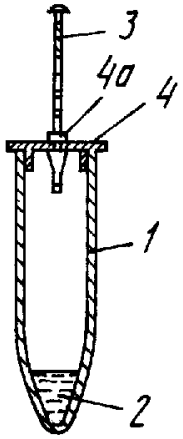
10. Устройство по пп. 6 9, отличающееся тем, что растворы реагентов включают в себя нуклеиновую кислоту или нуклеиновые кислоты и/или фермент или ферменты для специфической реакции.

11. Устройство по п.10, отличающееся тем, что растворы реагентов включают в себя ПЦР-буфер, дЦТФ, дГТФ, дАТФ, дТТФ, два или более олигонуклеотида, причем все реагенты рассчитаны на определенную ПЦР-реакцию, и термостабильную ДНК-полимеразу.

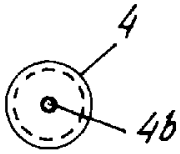
12. Устройство по пп.6 11, отличающееся тем, что реакционный сосуд выполнен из материала, не поглощающего или незначительно поглощающего ультрафиолетовое излучение.

RU 2082754 C1

RU 2082754 C1



Фиг. 2



Фиг. 3

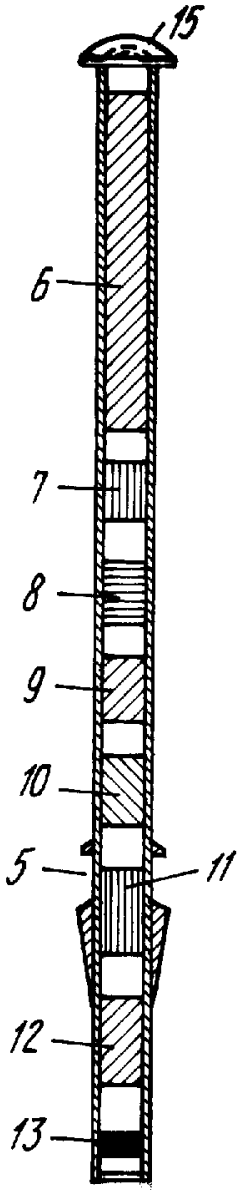
RU 2082754 C1

RU 2082754 C1

Фиг.4

RU 2082754 C1

RU 2082754 C1



Фиг.5

RU 2082754 C1

RU 2082754 C1