



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

⑤① Int. Cl.³: G 01 N 27/26

Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein

Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

⑫ **PATENTSCHRIFT** A5

⑪

642 454

⑫① Gesuchsnummer: 11548/78

⑫② Anmeldungsdatum: 09.11.1978

⑫③ Priorität(en): 10.11.1977 US 850507

⑫④ Patent erteilt: 13.04.1984

⑫⑤ Patentschrift
veröffentlicht: 13.04.1984

⑦③ Inhaber:
National Aeronautics and Space Administration,
Washington/DC (US)

⑦② Erfinder:
Benjamin Wolf Grunbaum, Morago/CA (US)

⑦④ Vertreter:
Patentanwalts-Büro Isler AG, Zürich

⑤④ **Mikroelektrophoretische Vorrichtung.**

⑤⑦ Die Vorrichtung zum Trennen und Identifizieren von Komponenten von zwei oder mehr Proteinsystemen umfasst eine durch mindestens einen Steg unterteilten, ein Gel enthaltende Schale zur Aufnahme der zu untersuchenden Eiweissgemische in getrennten Abteilen. Ferner weist sie eine durch mindestens einen Schlitz in Streifen unterteilte Membran auf. Die Streifen passen in die Abteile der Schale und können in direkte Berührung mit dem Gel in der Schale gebracht werden. Jeder Membranstreifen oder das Gel sind mit einem sichtbar machenden Reagens vorimprägniert, welches für ein polymorphes Proteinsystem spezifisch ist.

PATENTANSPRÜCHE

1. Mikroelektrophoretische Vorrichtung zum Trennen und Identifizieren von Komponenten von zwei oder mehr Proteinsystemen mit einer durch mindestens einen Steg unterteilten, ein Gel enthaltenden Schale zur Aufnahme der zu untersuchenden Eiweissgemische in getrennten Abteilen, gekennzeichnet durch eine Membran (16, 95, 115, 136), die durch wenigstens einen Schlitz (96) in Streifen (116, 138) unterteilt ist, die in Abteile (160) der Schale (120, 130, 140) passen und die in direkte Berührung mit dem Gel (104) bringbar ist, wobei entweder jeder Streifen (116, 138) oder das Gel mit einem sichtbar machenden Reagens, welches für ein polymorphes Proteinsystem spezifisch ist, vorimprägniert ist.

2. Elektrophoretische Membran für eine Vorrichtung nach Patentanspruch 1, in welcher das Gel nicht vorimprägniert ist, gekennzeichnet durch eine Celluloseacetatmembran, welche durch wenigstens einen Schlitz in wenigstens zwei Streifen unterteilt ist, wobei jeder Streifen mit einem sichtbar machenden Reagens, welches für eines der polymorphen Proteinsysteme aus der Milchsäure-Dehydrogenase, alkalische Phosphatase, Kreatin-Phosphokinase, Erythrocytsäure-Phosphatase, Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, Adenylatkinase, gruppenspezifische Komponente Gc, Lipoprotein, Adenosin-Deaminase, 6-Phosphoglukonat-Dehydrogenase, Glutamin-Pyruvin-Transaminase und Esterase D umfassenden Gruppe spezifisch ist, imprägniert ist.

3. Membran nach Patentanspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass dieselbe aus einer Polyestergrundschrift besteht, welche in den die Reagentien enthaltenden Streifenbereichen mit Celluloseacetat beschichtet ist.

4. Elektrophoretische Gelschale für eine Vorrichtung nach Patentanspruch 1, in welcher die Membran nicht vorimprägniert ist, gekennzeichnet durch eine flache, Gel enthaltende Schale, die durch mindestens einen Unterteilungssteg in wenigstens zwei Abteile unterteilt ist, wobei das Gel in jedem Abteil mit einem sichtbarmachenden Reagens imprägniert ist, welches für eines der polymorphen Proteinsysteme, die in Patentanspruch 2 aufgeführt sind, spezifisch ist.

5. Gelschale nach Patentanspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass dieselbe mit einer dicht schliessenden Abdeckung versehen ist, so dass die Einheit für eine geeignete mikroelektrophoretische Apparatur zur gleichzeitigen Bestimmung von bis zu 30 Proteinproben durch Elektrophorese verwendet werden kann.

6. Gelschale nach Patentanspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Schale und die Abdeckung in einer Gleitanordnung vereinigt sind.

7. Gelschale nach Patentanspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass dieselbe in dem Gel 30 Paar für die Probenaufnahme bestimmte Schlitzte enthält, wobei die Paare so angeordnet sind, dass eine Überkreuz-Wanderung von Antigen und Antiserum erreicht werden kann, so dass sich sichtbare Niederschlagslinien ausbilden.

8. Gelschale nach Patentanspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Schale durch parallele Stege in zehn Abteile unterteilt ist.

9. Gelschale nach Patentanspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass das Gel Isomere von Polyaminopolycarbon-säuren vom Typ, wie sie zur Elektrofokussierung verwendet werden, enthält.

Die Erfindung betrifft eine mikroelektrophoretische Vorrichtung zum Trennen und Identifizieren von Komponenten von zwei oder mehr Proteinsystemen mit einer durch mindestens einen Steg unterteilten, ein Gel enthaltenden Schale zur Aufnahme der zu untersuchenden Eiweissgemische in ge-

trennten Abteilen, wie sie in Patentanspruch 1 definiert ist. Die Erfindung betrifft ferner Membranen und Gelschalen, wie sie in Patentanspruch 2 bzw. Patentanspruch 4 definiert sind.

5 In einer älteren Patentanmeldung, nämlich DE-OS 27 52 029.2, die am 22. November 1977 eingereicht worden ist, ist eine in verschiedenen Richtungen verbesserte mikroelektrophoretische Vorrichtung beschrieben, durch welche mikroelektrophoretische Verfahren bzw. Untersuchungen 10 stark vereinfacht und standardisiert werden. Diese Vorrichtung umfasst (a) Modelle, in welchen sowohl eine Membran oder eine Platte in derselben Grundapparatur verwendet werden kann, (b) Modelle, in welchen die zweidimensionale Zerlegung einer Eiweissprobe, die auf eine gelgefüllte Schale bzw. 15 Platte aufgebracht worden ist, ermöglicht wird und (c) einen Probenapplikator und weitere Hilfsmittel, die das gleichzeitige und präzise Einsetzen und Ausrichten von beispielsweise 10 Proben erlauben.

Diese Apparatur kann in vorteilhafter Weise mit verschiedenen konventionellen Vorrichtungen und Techniken, die mit 20 in einzelne Abteile unterteilten Gelplatten bzw. -schalen arbeiten, wie sie von Siebert et al. in US-PS 3 616 387 (vgl. Figur 5 und Spalte 3, Zeilen 53 bis 55) beschrieben sind, und mit geschlitzten Membranen, wie sie von Zec in US-PS 3 317 418 25 (vgl. Figur 7) beschrieben sind, verwendet werden. Eine besondere Verbesserung wird zusammen mit den in der vorliegenden Patentschrift erläuterten Hilfsmitteln ermöglicht, indem die erfindungsgemässe Vorrichtung den Forschern und Laboratoriumstechnikern eine neue und verbesserte Methodologie zur Trennung spezifischer Proteine des Blutes in Mikrolitermengen erlaubt. Diese spezifischen Proteine werden dann durch Anwendung von immunologischen Techniken oder – häufiger – durch Anwendung von Indikatorfarbstoffen, die sich chemisch mit einer ganz bestimmten und keiner 30 anderen Eiweiss- bzw. Proteinart verbinden, identifiziert. Die Berührung dieser Farbstoffe mit den für die Elektrophorese bestimmten Proben erfolgt in der Form eines Überzuges, und zwar entweder als Celluloseacetatmembran auf Gel oder als Gel auf einer Celluloseacetatmembran. Die Überzüge sind 35 mit dem geeigneten spezifischen Substrat vorimprägniert worden, so dass auf der Celluloseacetatmembran ein permanenter visueller Nachweis des Musters erzeugt wird, gleichgültig, ob die Membran als Unterlagemedium oder als Überzug dient. Diese Technik ist von Grunbaum in der Arbeit «An 40 Automatic One-to-Eight Sample Applicator for Fast Qualitative and Quantitative Microelectrophoresis of Plasma Proteins . . .», Microchem. J. 20, 495–510 (1975) beschrieben worden.

Die Apparatur ist anwendbar in der reinen Forschung sowie auf den Gebieten der Medizin, Immunologie, Genetik, 45 Biochemie und der Gerichts-Naturwissenschaft. Elektrophoretische Verfahren, die in erheblichem Masse die Anwendbarkeit der Apparatur erhöhen, umfassen Bestimmungen signifikanter polymorpher Enzymsysteme wie Milchsäure-Dehydrogenase (LDH), alkalische Phosphatase (AP) und Kreatin-Phosphokinase (CPK). Sie kann für diagnostische Zwecke zur Bestimmung von spezifischen Antikörpern von Antigenen im Blut verwendet werden. In Gerichtslaboratorien kann sie zur Phänotypisierung genetischer Varianten von Enzymen 50 oder anderen Proteinen im Blut zum Zwecke der Identifizierung oder Individualisierung dienen.

Eine partielle Liste der Faktoren im Blut, die unter Verwendung der Apparatur bestimmt werden können, umfasst folgende Substanzen:

55 Milchsäure-Dehydrogenase (LDH),
alkalische Phosphatase (AP),
Kreatin-Phosphokinase (CPK),
Erythrocytsäure-Phosphatase (EAP),

Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G-6PD),
 Adenylatkinase (AK),
 Hämoglobin (Hb),
 Haptoglobin (Hp),
 gruppenspezifische Komponenten (Gc),
 Lipoprotein (Lp),
 Adenosin-Deaminase (ADA),
 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase (6-PGD),
 Glyoxylase I (GLO-I),
 Glutamin-pyruvin-transaminase (GPT),
 Esterase D (EsD),
 Glutathion-Reduktase (GsR),
 Immunglobuline (Ig).

Die gruppenspezifischen Komponenten Gc sind besondere α -Globuline, die unter anderem in Naturwissenschaften, 49, Seiten 16/17 und 108 (1962) beschrieben sind.

Die Erfindung betrifft ferner Membranen und Gelschalen, wie sie in Patentanspruch 2 bzw. Patentanspruch 4 definiert sind.

Mit Hilfe der vorliegenden Vorrichtung ist es jetzt unter anderem möglich, genau und schnell gleichzeitige elektrophoretische Trennungen mehrerer polymorpher Proteinsysteme unterschiedlichen Ursprungs oder unterschiedlicher Natur, sowohl auf einem Gel als auch auf einer Membran durchzuführen und sichtbare Nachweise von Mustern zu entwickeln, die durch Berührung der der Elektrophorese unterworfenen Proben entweder mit einer Membran oder einem Gel (entsprechend der jeweiligen Situation) entwickelt worden sind, wobei die Membran oder das Gel mit einem geeigneten spezifischen Reagens zum Sichtbarmachen des der Elektrophorese unterworfenen Proteinsystems vorimprägniert worden ist.

Die Verfügbarkeit der neuen abgepackten Gele und Membranen, beide für die Elektrophorese und, wenn mit spezifischen Substraten vorimprägniert, zur Entwicklung der elektrophoresierten (d.h. elektrophoretisch behandelten) Proteine, erlaubt ein hohes Ausmass an Standardisierung zwischen weit auseinanderliegenden Laboratorien. Eine solche Verbesserung wird auf medizinisch-diagnostischem Gebiet willkommen sein, von ganz unschätzbarem Wert ist sie jedoch bei Massenuntersuchungen auf dem Gebiet der Phänotypie, wie sie sowohl in der genetischen Forschung als auch zu Identifizierungszwecken für gerichtliche Untersuchungen u.ä. durchgeführt werden.

Die beigelegten Zeichnungen dienen zur weiteren Erläuterung der Erfindung. In den Zeichnungen bedeuten

Figuren 1A bis 1J eine Darstellung zweier Ausführungsformen der Grundapparatur gemäss der Erfindung in auseinandergezogener Form und im Querschnitt: links mit einer Membran und einer Membranbrücke; rechts mit einer Gelschale und einer Geltemperaturkontrollplatte;

Figur 2 einen Querschnitt durch die zusammengesetzte Apparatur mit Membran und Membranbrücke;

Figur 3 eine Vorderansicht des Tanks von Figur 1 zusammen mit einer Gelschale und einer Temperaturkontrollplatte;

Figuren 4A bis 4D eine auseinandergezogene Vorderansicht der Apparatur von Figur 2 mit Membran und Membranbrücke;

Figur 5 eine Seitenansicht der Temperaturkontrollplatte, die mit der Gelschale benutzt wird,

Figur 6 eine Detailansicht der Applikatorspitze von Figur 1;

Figur 7 eine Draufsicht auf eine in Abteile unterteilte Schale;

Figuren 7A und 8 Querschnitte durch die Gelschale mit den Abteilen von Figur 7 sowie einer Gelschale ohne Unterteilungen;

Figur 9 eine Draufsicht auf einen einrastenden, dicht schliessenden Deckel für die Gelschalen von Figuren 7 und 8;

Figure 10 und 11 einen Querschnitt durch die Vorderansicht einer Gelschale mit Abteilen bzw. Unterteilungen, die zur Aufnahme eines Gleitdeckels bestimmt ist;

Figuren 12 und 13 Querschnitte durch die Vorderansicht einer weiteren Ausführungsform einer Gelschale mit Abteilen, auf die der Gleitdeckel aufgesetzt ist;

Figur 14 einen Querschnitt durch die Vorderansicht einer Schale mit Deckel, wobei die Schale ein Gel enthält, welches von einer geschlitzten Membran überlagert ist;

Figur 15 eine Draufsicht auf eine in vier Abteile unterteilte Schale, welche ein Gel enthält und eine über dieses gelegte, geschlitzte Membran;

Figur 16 einen Querschnitt durch die Vorderansicht einer Schale gemäss Figur 15 zusammen mit dem einschiebbaren Deckel (Gleitdeckel);

Figur 17 eine Draufsicht auf ein geschlitztes Blatt Filterpapier, welches mit verschiedenen Entwicklergemischen zum Entwickeln der elektrophoresierten Proteine imprägniert ist;

Figur 18 eine Draufsicht auf eine weitere Ausführungsform des geschlitzten Blattes von Figur 17, welches aus einer Polyester-Grundschrift besteht, welche mit Celluloseacetat beschichtet ist;

Figur 18A einen Querschnitt durch das Blatt von Figur 17;

Figur 19 einen Teil eines entwickelten Elektrophoretogrammes, auf welchem drei Proteingemische in Gegenwart von je zwei geeigneten Protein-Standardpräparaten in zwei verschiedenen Konzentrationen getrennt worden sind;

Figur 20 eine Draufsicht auf eine viereckige Schale mit einer eingegossenen Schicht eines Geles, welches mit Amphophilen, die zum Elektrofokussieren dienen, vermischt ist;

Figur 21 eine Draufsicht auf eine viereckige Schale, die mit einem zuvor eingegossenen Gel gefüllt ist, welches zur Elektrophorese des Haptoglobin-Hämoglobin-Komplexes oder anderer Proteine dient;

Figur 22 eine Vergrößerung des Bereiches der Schale von Figur 21, in welcher die die Probe aufnehmenden Vertiefungen in dem Gel angeordnet sind;

Figur 22A den Bereich der Schale von Figur 22, jedoch versehen mit einer entfernbaren geschlitzten Wegwerfschablone aus Plastikmaterial;

Figur 22B einen Querschnitt der Vorderansicht der Schalen-Schablonen-Einheit von Figur 22A;

Figur 23 eine Draufsicht auf eine Schale mit einem zuvor eingegossenen Gel, welches für die Überkreuz-Elektrophorese bestimmt ist.

Die Apparatur wird zunächst mit Bezug auf die Figuren 1A bis 1F, 2 und 4 – soweit es sich um die Ausführungsform mit einem Membransystem handelt – und mit Bezug auf die Figuren 1A, 1B, 1E bis 1J und 3 – soweit es sich um die andere Ausführungsform mit einem Gel handelt – beschrieben. Die einzelnen Figuren werden gleichzeitig erläutert, um Wiederholungen zu vermeiden und die Zusammenhänge zu verdeutlichen.

Hinsichtlich des Membransystems zeigen die Figuren 1 und 2 Querschnitte der Apparatur in auseinandergezogener und zusammengesetzter Form, während die Figuren 4A bis 4D eine auseinandergezogene Vorderansicht derselben Teile darstellen.

Die Vorrichtung besteht aus einem Tank bzw. Behälter 10, welcher eine Elektrolytlösung (nicht dargestellt) enthält. In dem Behälter sind Zwischenwände 19 fest angeordnet. Weiterhin sind entfernbare Zwischenwände 24, eine Scheidewand 23, Elektrodenrahmen 26 und 28, welche sich aus Schlitzten in der Innenwand 8 bis in Schlitzte in der Innenwand 9 erstrecken, vorgesehen. Auf der Scheidewand 23 sitzen ein Membranhalter 14 und zwei der entfernbaren Zwischenwände 24. Man erkennt weiterhin die Nut 20 des Membran-

halters 14, die am oberen Ende der Scheidewand 23 anliegt. Der Membranhalter 14 weist Zungen 21, 22 und Zähne 18 auf. Die Zähne 18 greifen in Perforationslöchern in einer Membran 16 ein und halten den Mittelteil der Membran gespannt. Die Enden der Membran 16 tauchen in die Elektrolytlösung (nicht dargestellt) ein. Die Membran muss aus einem Material hergestellt sein, das die Elektrolytlösung in alle Bereiche derselben saugt, so dass die Membran stets gesättigt bleibt. Darüberhinaus muss die Membran eine ausreichende Festigkeit aufweisen, um der Kraft der Zähne zu widerstehen, wenn sie nass ist. Die Membran kann beispielsweise aus Celluloseacetat, Papier oder dem Material Cellogele hergestellt sein. Eine Celluloseacetatmembran kann als beständiger Nachweis der Analyse aufbewahrt und gelagert werden.

Eine Applikatoreinheit 30 passt auf die Abdeckung 12. Die Applikatoreinheit ist mit zwei Füßen 33, 34 ausgestattet. Der Fuss 34 weist einen von ihm abstehenden Registrierstift 38 auf, während der Fuss 33 mit einem abstehenden Laufstift 35 ausgestattet ist. Der Registrierstift 38 und der Laufstift 35 sind so ausgebildet, dass sie in einen Laufstiftschlitz bzw. Registrierstiftloch an der Abdeckung 12 bzw. dem Probenhalter eingreifen können.

Die Abdeckung 12 weist männliche und weibliche Verbindungen 11, 13 auf, welche den Kontakt mit dem Elektroden Draht 29 über Federzwischenverbindungen 15 bzw. 17 an dem Elektrodenrahmen 26 herstellen. Wenn die Abdeckung 12 von dem Behälter 10 abgenommen wird, wird die elektrische Verbindung zu dem Elektroden Draht 29 durch die Federverbindungen unterbrochen. Der Elektroden Draht 29 ist in seinen Einzelheiten in Figur 1B dargestellt. Ein Platindraht 29 läuft um den geschlitzten Umfang des Elektrodenrahmens 26. Der Draht ist mit Metallkontakten 25 und 27 verbunden, die eine Leitung zu den Federverbindungen 15 und 17, die in Figur 2 dargestellt sind, herstellen. Wie man aus Figur 4D erkennt, sind die beiden Elektrodenrahmen 26 und 28 in den Behälter 10 eingesetzt, welcher in seinen Wänden Schlitz aufweist, die die Rahmen aufnehmen können.

In den Figuren 1F und 4A ist die Applikatoreinheit dargestellt, welche mehrere Applikatorknöpfe 39 aufweist, die ihrerseits dazu dienen, einen Applikator zu halten, der in seinen Einzelheiten in Figur 6 dargestellt ist.

Die Applikatorknöpfe 39 werden mit einer Anzahl von Blattfedern 45 gehalten, die jeden Knopf einzeln an seinem Platz halten. Ein Freigabeknopf 40 ist mit einem verlängerten Arm 41 ausgestattet, der sich über alle parallel ausgerichteten Blattfedern 45 erstreckt. Wird der Knopf 40 nach unten gedrückt, so werden alle Blattfedern freigesetzt, was dazu führt, dass alle Applikatorknöpfe 39 infolge der Schwerkraft nach unten fallen. Der Freigabeknopf 40 ist mit einer Nut 42 ausgestattet, in welche, wenn der Knopf in der heruntergedrückten Stellung ist, ein Verschlussstab 44 eingreift, so dass der Freigabeknopf in der unteren Stellung gehalten wird. Wird der Applikator nicht betätigt, so sitzt eine Schutzkappe (nicht dargestellt) über der Öffnung in der Abdeckung 12.

In Figur 6 sind weitere Einzelheiten der Applikatorspitze 46 gezeigt. Die Applikatorspitze weist eine Kapillaröffnung 47 zur Aufnahme der Probenflüssigkeit auf. Die Applikatorspitze 46 wird durch zwei unter Federkraft stehende Splinte 49 an ihrer Stelle gehalten, so dass die Spitze leicht entfernt werden kann.

Die Applikatorspitze 46 kann unterschiedliche Länge oder Breite aufweisen, um so beispielsweise die Menge der darin enthaltenen Probe zu verändern, oder um mehr als eine Aufbringungsstelle zu versorgen.

In den Figuren 1D und 4C ist der Membranhalter 14 in allen Einzelheiten dargestellt. Der Membranhalter ist einstückig aus einem flexiblen Plastikmaterial gegossen. Der Halter weist Zähne 18 auf und lässt sich nach innen biegen, so dass

die Zähne 18 in die entsprechenden Perforationslöcher in einer Membran 16 eingreifen. Nach dem Freigeben geht von dem Halter 14 eine Zugkraft auf die Membran aus, so dass letztere gespannt gehalten wird. Um ein Reißen der Membran zu verhindern, sind die Zähne 18 vorzugsweise halbzylindrische oder zylindrische Vorsprünge, während die Membran-Perforationslöcher 113, siehe Figur 19, rund sind.

Das elektrophoretische Gelsystem wird durch die Figuren 1A, 1B, 1F bis 1J, 3 und 5 verdeutlicht, welche einen auseinandergezogenen Querschnitt und eine Vorderansicht der zusammengesetzten Teile zeigen. In diesem System sind die Membran 16 und der Membranhalter 14 durch eine Gelplatte oder -schale 103, eine Geltemperaturkontrollplatte 80 und einen Fließpapierstreifen 107 ersetzt.

Die Temperaturkontrollplatte 80 ist mit vier Haltern ausgestattet, von denen zwei, nämlich 82 und 84, gezeigt sind. Die Halter 82 und 84 dienen dazu, eine viereckige Schale 103 aufzunehmen und an der Stelle zu halten. Die Schale 103 enthält das Gelmaterial 104, z.B. ein Agarosegel, welches zur Lipoproteintrennung verwendet werden kann. Eine Temperaturkontrollflüssigkeit, die von der Flüssigkeitszufuhr 99 durch die Zuführöffnung 100 zugeführt und durch die Abführöffnung 102 abgeführt wird, zirkuliert in der Platte 80; vgl. Figur 5.

In Figur 3 ist die Temperaturkontrollplatte 80 in dem Behälter 10 angeordnet. Die quadratische Schale 103 mit dem Gel 104 ist auf die Platte 80 gesetzt und wird von den Haltern 82, 84 an Ort und Stelle gehalten. Die Schale 103 ist vorzugsweise aus einem Material hergestellt, das eine gute elektrische Isolierungswirkung hat und eine gute thermische Leitfähigkeit aufweist. Darüberhinaus muss die Schale gegenüber der Elektrolytflüssigkeit inert sein. Da die Platte zur Aufnahme einer quadratischen Schale ausgebildet ist, ist eine Drehung des Gelmediums um 90° möglich. Eine grössere Auftrennung kann erreicht werden, wenn man zwei Wanderungsrichtungen auf dem Gel 104 zulässt. Zuerst wird die Probe auf einem linearen Weg durch den elektrischen Strom auseinandergezogen. Danach wird die Gelschale um 90° gedreht und es wird eine zweite Trennung in einer Richtung senkrecht zur ersten Richtung vorgenommen.

Der Kontakt mit der Elektrolytlösung erfolgt über die Dochte 106, 108, welche an den Rändern auf dem Gel aufliegen und sich nach unten durch Dochtlöcher (nicht dargestellt) in der Platte 80 in die Elektrolytlösung erstrecken. Der Behälter 10 weist Dochtalter 110 und 111 auf, die die unteren Enden der Dochte aufnehmen und diese in der Elektrolytlösung an der Stelle halten. Die Dochtalter verhindern, dass die Dochte von dem Gel abgleiten und sie richten die Dochte aus, so dass sie das Gel 104 gleichmässig über die ganze Oberfläche berühren. Die Ausrichtung der Dochte verhindert, dass sich ein Kontaktgradient ausbildet. Die Dochte 106 und 108 können beispielsweise aus Filterpapier oder einem Kunststoffschwamm-Material bestehen.

Während des Elektrophoreseprozesses fließt elektrischer Strom durch das Gel 104 und bewirkt dabei die Entstehung von Wärme in dem Gel. Durch die thermische Leitfähigkeit in dem Gel werden die Banden verbreitert, was zu Fehlern führt infolge einer ungenügenden Auftrennung. Diese Verbreiterung der Banden wird erleichtert, wenn man eine Flüssigkeit durch die Platte 80 leitet, deren Temperatur niedriger ist als die Umgebungstemperatur. Bei einigen Massnahmen hat es sich als günstig erwiesen, wenn die Plattentemperatur bei etwa 4 °C liegt. Fließpapierstreifen 107, die aus demselben Material hergestellt sind wie die Dochte 106, 108 und die mit der Elektrolytlösung imprägniert sind, sind längs der Ränder der Oberfläche des Gels 104 angeordnet, um den elektrischen Kontakt zwischen dem Gel und den Dochten während der Elektrophorese zu erleichtern.

Die restlichen Figuren erläutern verschiedene Ausführungsformen von Schalen und Deckeln bzw. Abdeckungen (Figuren 7 bis 16 und 20 bis 21A) sowie von Membranen (Figuren 17 bis 19) gemäss vorliegender Erfindung, die in der eingangs erwähnten Apparatur zur Durchführung diagnostischer Untersuchungen und zu Identifizierungszwecken verwendet werden können.

In Figur 7 erkennt man eine Draufsicht auf eine Elektrophoreschale 120, welche im wesentlichen aus einem quadratischen Behälter mit flacher Bodenfläche 128 und einer umlaufenden Wand 122 besteht. Eine Anzahl von geraden Unterteilungsrippen 121 trennen die Schalenfläche in einzelne Abteile, die dauerhaft gekennzeichnet sind, indem in jedes Abteil 160 ein Buchstabe eingedruckt ist. Die umlaufende Wand kann mit einer oberen Kante 123 versehen sein, die eine Schulter 129 bildet, die mit einem entsprechenden umlaufenden Rand an einer Abdeckung zusammenwirkt. Die in Abteile unterteilte Schale 120 ist in Figur 7A im Querschnitt dargestellt. In Figur 8 ist daneben, ebenfalls im Querschnitt, eine Ausführungsform einer üblichen Gelschale 103 dargestellt, die mit einer Gelschicht 104 gefüllt ist.

Figur 9 zeigt eine Art einer Abdeckung für Gelschalen 103, 120, welche im wesentlichen aus einer dünnen flachen Platte 127 besteht, welche einen umlaufenden Rand 126 aufweist und so ausgebildet ist, dass sie dicht in den umlaufenden Rand 123 an der Schulter 129 der Gelschalen 103, 120, passt. Eine zusammengesetzte Anordnung aus Schale und Abdeckung erkennt man in Figur 14. Diese besteht aus der Schale 120, der Abdeckung 125, der Gelschicht 104 und der geschlitzten Membran 95, alle im Querschnitt dargestellt. Die Ausführungsformen aus Schale und aufpressbarer Abdeckung, die in den Figuren 7 bis 9 und 14 dargestellt sind, können ausserdem mit verschiedenen üblichen Hilfsmitteln zum dichteren Verschiessen der Einheit und zum Stapeln versehen sein.

Die Figuren 10 bis 13 zeigen weitere Ausführungsformen der Schalen und Abdeckungen gemäss vorliegender Erfindung, wobei entweder eine Abdeckung 135 in einer von den Wänden einer Schale 130 gebildeten Laufrille oder aber eine Schale 140 in einer von den Wänden einer Abdeckung 145 gebildeten Laufrille gleitet. Eine ausreichende Abdichtung der zusammengefügt Einheiten aus Schale und Abdeckung kann auf verschiedene Weise erreicht werden. Beispielsweise können sowohl die Schalen 140 als auch die Abdeckung 145 an gegenüberliegenden Seiten mit senkrecht zu den Laufrillenwänden 131, 132 verlaufenden Endwänden (nicht dargestellt) versehen sein, so dass die Enden der Einheit geschlossen sind. Es ist auch möglich, flache ebene Flächen (nicht dargestellt) oder Schultern in den Endwandbereichen der Schalen vorzusehen, die dicht mit den Abdeckungsflächen zusammenpassen und so eine zusätzliche Abdichtung bilden.

Figur 15 zeigt in der Draufsicht eine Schale, die der von Figur 14 entspricht, jedoch mit der Ausnahme, dass die Schale nur drei sie unterteilende Stege bzw. Rippen 121 aufweist. Kreisförmige Löcher 113 dienen zur Aufnahme der Zähne 18 des Membranhalters 14, der in den Figuren 1D und 4C gezeigt ist. In der Figur 15 sowie im Querschnitt derselben Schale, die in Figur 16 gezeigt ist, erkennt man also eine Schale 130 mit vier Abteilen, die von den drei Stegen bzw. Rippen 121 gebildet werden. Man erkennt weiterhin in Figur 16 die zwischen den Laufrillen 131 gleitende Abdeckung 135. Die Abteile sind mit einem Gel 104 gefüllt, auf welchem die Elektrophorese verschiedener Blutenzym- und Proteinsysteme durchgeführt worden ist, sowie eine geschlitzte Membran 95, welche vier Streifen 160 aufweist, die mit den Buchstaben A, B, C und D markiert und durch Schlitze 96 getrennt sind. Die geschlitzte Membran liegt über dem Gel, so dass sie die Proteine auf dem Gel mit den Enzymsubstraten oder

Farbreagentien, mit denen sie zuvor imprägniert worden ist, in Berührung bringt. Auf diese Weise ist beispielsweise eine Blutserumprobe, welche die Isoenzyme der Milchsäure-Dehydrogenase (LDH) enthält, auf das Gel 104 im Abteil A der Schale 130 aufgebracht worden, welches nach der elektrophoretischen Trennung mit dem Streifen A der Membran 95 in Berührung gebracht wurde, der zuvor mit Tetrazoliumfarbstoff oder anderen üblichen Komponenten imprägniert worden ist, die dazu dienen können, das Elektrophoretogramm dieses bestimmten Enzymsystems sichtbar zu machen. In entsprechender Weise wurden die anderen Abteile und Streifen (B, C, D) verwendet, um die Komponenten verschiedener polymorpher Enzyme des Blutes sowie anderer Proteinsysteme entweder aus der gleichen Blutprobe oder aus Blutproben verschiedenen Ursprungs festzustellen und zu identifizieren. In den übrigen Abteilen und unter Verwendung der Streifen B, C bzw. D wurden so Kreatin-Phosphokinase (CPK) alkalische Phosphatase (AP) und Gesamt-Protein gleichzeitig elektrophoretisiert und entwickelt; vgl. ebenfalls Figur 15.

Die Figuren 17 und 18 zeigen Draufsichten auf Teile von zwei verschiedenen geschlitzten Membranen, die mit Substraten oder anderen farberzeugenden Reagentien vorimprägniert worden sind, welche für die Proteinsysteme, die in den Zeichnungen angegeben sind, erforderlich sind.

So erkennt man in Figur 17 fünf Streifen 116 einer durch Schlitze 96 getrennten Membran 115, die mit den Buchstaben A, B, C, D und E bezeichnet sind und die sich bis zu den umlaufenden Randflächen 116 erstrecken. Die ganze Membran 115 kann aus Filterpapier hergestellt sein, wobei die Randflächen 116 mit Paraffin getränkt und die einzelnen Streifen mit Substraten oder Entwicklungsflüssigkeiten imprägniert sind, die für die angezeigten Enzym- und Proteinsysteme, nämlich (LDH)(A), CPK(B), Plasmaprotein(C), Hämoglobin(D) sowie andere Systeme (XYZ) (E) erforderlich sind. Nach dem Entwickeln kann die getrocknete Membran als dauerhafter Nachweis des Elektrophoretogramms aufbewahrt werden.

In den Figuren 18 und 18A ist ein undurchlässiger Typ einer Membran dargestellt. Auch hier ist die Membran 136 wiederum durch Schlitze 96 in Streifen geteilt, wobei jeder Celluloseacetatstreifen (A,B,C,D) mit einem bestimmten Enzymsubstrat und/oder Farbreaktionssystem wie angezeigt, nämlich CPK, LDH, Phosphoglucosemutase (PGM) sowie anderen Systemen (XYZ) auf dem Streifen A, B, C bzw. D imprägniert ist. Ein wesentliches Kennzeichen dieser bestimmten Membran ist jedoch, dass die Celluloseacetatstreifen 138 von einer inerten, resistenten und nicht porösen Polyesterplatte 137 (Mylar-Polyester) getragen werden, wie sich besonders deutlich aus Figur 18A ergibt, einem Querschnitt durch die Membran von Figur 18. Weitere Polymersubstanzen wie Polyamide, Polyimide, Polyäthylen, halogenierte Polyäthylene u.ä. können ebenfalls anstelle eines Polyesters als inerte nicht poröse Unterlageplatte dienen, wenn dies im Einzelfall erwünscht ist.

Figur 19 zeigt den Typ eines Musters, das sich auf einer Membran nach der Trennung und der Farbreaktion zeigt. Drei Streifen, 200, 201 und 202 einer Membran 95, welche durch Schlitze 96 getrennt sind, sind dargestellt. Jeder Streifen weist drei mit A, B und C bezeichnete Kolonnen 160 auf. Auf jeden Streifen war eine andere polymorphe Blutenzymprobe aufgebracht worden, die anschliessend elektrophoretisch auseinandergezogen, d.h. zur Wanderung weg vom ursprünglichen Aufbringungspunkt gebracht worden ist. Der Aufbringungspunkt ist die erste Reihe (I) unter dem Punkt A; von diesem aus geht die Wanderung zu den Strichen, die in den Entfernungen II, III, IV, V und VI angezeigt sind. Standardpräparate polymorpher Systeme laufen zusammen mit jeder unbekannten Probe in zwei unterschiedlichen Konzentrationen B und C, um so die Identifizierung und die Mengen-

bestimmung der unbekannten Proben zu unterstützen. Durch Vergleich der Komponenten der unbekannten Substanz in Kolonne A des Streifens 200 mit den benachbarten Kolonnen B und C lässt sich leicht erkennen, dass die Komponente IV der Probe offensichtlich höher in der Konzentration ist als normal (B, C). Dasselbe gilt für die Menge der Komponente VI der Probe im Streifenteil 202. Bei der Probe im Streifen 201 erkennt man andererseits, dass die Komponente V fehlt und dass eine Komponente VI aufscheint, die in den Standardpräparaten B und C nicht vorhanden ist. In diesem Fall handelt es sich also um den Typ des gleichzeitig hergestellten Ein-Blatt-Nachweises, der mit der Vorrichtung und der Arbeitsweise gemäss vorliegender Erfindung durchgeführt werden kann und der zur Identifizierung und quantitativen Bestimmung von bis zu 10 verschiedenen oder gleichen Proteinsystemen aus einer Blutprobe oder von bis zu 10 Blutproben dienen kann. Mit solchen Profilen wird die Aufgabe der Diagnostizierung verschiedener klinischer Zustände oder die Identifizierung von Klassen von Individuen erheblich vereinfacht infolge der Menge an Information, die gleichzeitig auf einem Elektrophoretogramm erzeugt und beobachtet werden kann.

Figur 20 stellt eine Draufsicht auf die bereits beschriebene quadratische Schale 103 dar, welche mit einem Polyacrylamid-Gel 104, in welchem Ampholine dispergiert sind, gefüllt ist; diese Art von Isomeren von Polyaminopolycarbonsäuren werden üblicherweise für Elektrofokussierungsverfahren mit hoher Trennschärfe verwendet. Nach Anlegen eines elektrischen Feldes mit Hilfe von speziellen Elektroden (nicht dargestellt), welche direkt auf die Oberfläche des Gels gesetzt werden, bildet sich ein linearer pH-Gradient aus und die in einem solchen Gradienten elektrophoresierten Proteinmoleküle konzentrieren sich in sehr schmalen Zonen, in welchen die elektrische Nettoladung an einem gegebenen Molekül Null ist. In einem solchen System ist die einzige Variable, die die Trennung beeinflusst, der isoelektrische Punkt eines gegebenen Proteins. Es ist nicht erforderlich, in den Behälter 10 der Grundapparatur gemäss Figur 1A eine Pufferlösung zu geben. Die Kühlung des Gels mit der Platte 80 gemäss Figuren 3 und 5 ist sehr wichtig, weil eine sehr hohe Spannung angelegt wird, die eine hohe Stromstärke zur Folge hat, was wiederum die Entwicklung einer grossen Wärmemenge bedeutet, die sofort abgeführt werden muss. Die erfindungsgemässe Apparatur erlaubt es, die Elektroden in beliebiger Richtung anzubringen. Darüberhinaus bietet sie eine einfache, leicht standardisierbare Alternative zu der schwierigen Herstellung von Gelen unmittelbar vor der Verwendung, eine Alternative, die hinsichtlich der Handhabung, des Transportes und der Lagerung den bisher handelsüblichen flexiblen Platten überlegen ist.

Figur 21 ist eine Draufsicht auf eine Schale 103, welche ein zuvor eingegossenes Gel 104 enthält. In dem Gel sind in einer Reihe 10 rechteckige Vertiefungen 148 zur Aufnahme von Proben gemacht worden. Der Teil der Schale, der die zur Probenaufnahme bestimmten Vertiefungen 148 enthält, ist in vergrössertem Massstab in Figur 22 dargestellt, um weitere Einzelheiten zu zeigen. Die Schalen-Schablonen-Einheit erkennt man weiterhin in der Figur 22A (in Draufsicht) und in Figur 22B (im Querschnitt).

In diesen Figuren erkennt man, dass die umlaufende Wand 122 der Schale 103 mit zwei zylindrischen Vertiefungen 149 versehen ist, die zur Aufnahme von Stiften 151 dienen, mit welchen ein entfernbare Kunststoffeinsatz bzw. eine solche Schablone 15 in der Schale befestigt werden kann. Die dargestellte Schablone 150 weist zehn Zungen 151 auf, mittels welcher die Vertiefungen 148 in dem Gel ausgebildet werden, wenn dasselbe zuerst in die Schale 103 gegossen wird und um die Vertiefungen in der Zeit zwischen der Herstellung und der

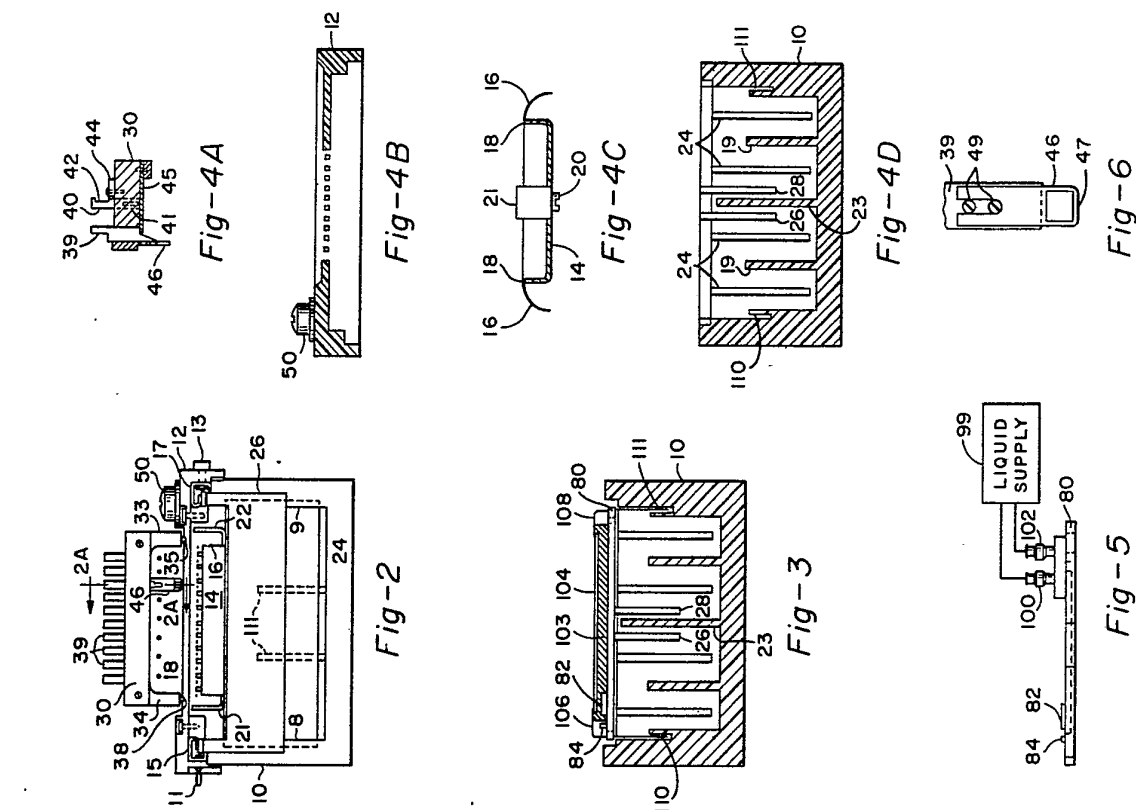
Verwendung des Einsatzes frei von Flüssigkeit zu halten. Die in Figur 21 dargestellte Schale mit dem eingegossenen Gel wurde also in der Weise hergestellt, dass zunächst der Einsatz bzw. die Schablone 150 in eine leere Schale 103 eingesetzt wurde, indem die Stifte 151 in die Vertiefungen 149 gesteckt wurden. Ein Gel bildendes flüssiges Präparat wurde dann in die Schale gegossen, so dass sich nach dem Abkühlen das Gel 104 bildete. Die Schale mit dem Gel wurde mit einer geeigneten Abdeckung (nicht dargestellt) versehen; in dieser Form kann die Einheit zum Versand gebracht oder gelagert werden, ohne dass eine Beschädigung befürchtet werden muss, bis sie für die Elektrophorese gebraucht wird. Zu diesem Zeitpunkt wird der Plastikeinsatz bzw. die Schablone 150 entfernt und Proteinproben und Standardpräparate können in die Vertiefungen 148 des Gels für die Elektrophorese gegeben werden. Diese vorstehend beschriebene Art einer Schale wird hauptsächlich für die genetische Typisierung von polymorphen Proteinen verwendet, beispielsweise für die Bestimmung des Haptoglobin-Hämoglobin-Komplexes; sie kann jedoch auch zur Trennung vieler anderer Proteingemische, die ein hochwirksames Trennmedium wie Acrylamidgel erfordern, verwendet werden. Das Polyacrylamidgel in der Schale kann entweder eine durchgehend gleichmässige Polymerkonzentration oder eine sich linear stufenweise ändernde Konzentration aufweisen. Die Polyacrylamidmoleküle wirken als ein mechanisches Sieb, welches sowohl die Trennung als auch die Abscheidung unterstützt.

In Figur 23 ist eine quadratische Schale mit einem eingegossenen Gel dargestellt, in welcher die Verwendung spezifischer Antiseren bei der Kreuz- und Quer-Elektrophorese bei der Analyse von australischem Antigen (infektiöse Hepatitis), Syphilis und anderen Infektionskrankheiten möglich ist. Die Schale und die Methode können auch zur Artenidentifizierung bei der Prüfung von frischem oder getrocknetem Blut oder anderen physiologischen Flüssigkeiten eingesetzt werden. Man erkennt aus den Zeichnungen, dass die vorbereitete Gelschale 103 im Grundsätzlichen der von Figur 21 entspricht, jedoch mit der Ausnahme, dass die Gelschicht 104 mit drei Linienpaaren von je 10 Vertiefungen 148 versehen ist, wobei die Linien mit 1, 2, 3, 4, 5 und 6 (160) bezeichnet sind. Die Schalen werden in derselben Weise hergestellt wie die von Figur 21, wobei jedoch 6 Plastischablonen anstelle einer einzigen (150), die für die Schalen der Figuren 21 bis 22B benutzt wurde, verwendet werden müssen. Die Schablonenstifte 151 (Figuren 22A und 22B) fassen in zylindrische Vertiefungen 149 und die Schale wird dann in der bereits beschriebenen Weise mit Gel 104 gefüllt. Vor der Verwendung werden die Schablonen entfernt, so dass die Vertiefungen 148 zur Aufnahme von Antigen- und Antiserumproben frei liegen. Die Gelvertiefungen werden paarweise verwendet, wobei die Antigenprobe in die Vertiefung gegeben wird, die auf der elektrisch negativen Seite des Paares (Reihen 1, 3 und 5) liegt, die durch ein Minuszeichen (−), welches auf die linke Seite der umlaufenden Schalenwand 122 gedruckt ist, angezeigt ist; die spezifische Antiserumprobe wird in die Vertiefung auf der positiven Seite des Paares (Reihen 2, 4 und 6) gegeben. Wird Spannung an die bis zu 30 Proben in der Schale gelegt, so wandern die Antigen- und Antiserumproteine aufeinander zu und reagieren, wenn sie sich kreuzen oder treffen, und erzeugen eine sichtbare Niederschlagslinie. Neun solcher Linien 205, die sich nur zwischen bestimmten Paaren gebildet haben, sind in Figur 23 zu erkennen. Das Fehlen einer solchen Niederschlagslinie zwischen einem Paar von Vertiefungen zeigt die Abwesenheit des spezifischen Antigens in der Probe, die in die linke Vertiefung des Paares gegeben worden war, an.

Bei der Herstellung der verschiedenen vorbereiteten Gel-

schalen und Membranen der vorstehend beschriebenen Art ist es möglich, die Zugabe aller instabilen Substrate und Reagentien zu dem vorbereiteten Gel bzw. der vorbereiteten Membran bis zum Augenblick der Verwendung hinauszuzögern.

Im Falle von Membranen ist es jedoch auch möglich, instabile Irgredientien sicher zum Zeitpunkt der Herstellung der Membran einzuschliessen, indem man die Technik der Gefriertrocknung anwendet.



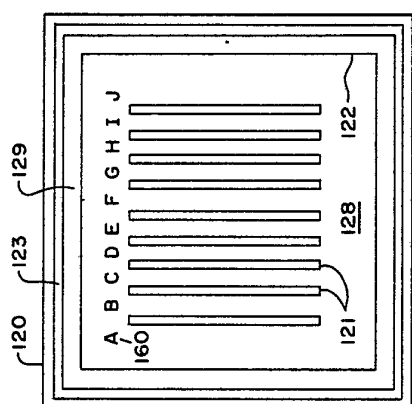


Fig-7

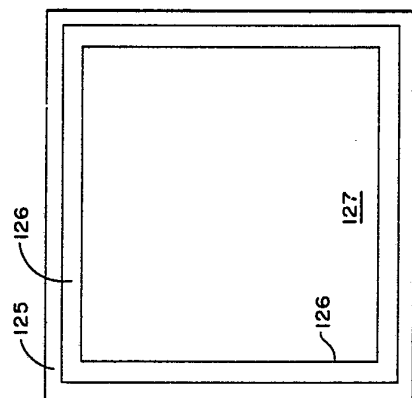


Fig-9

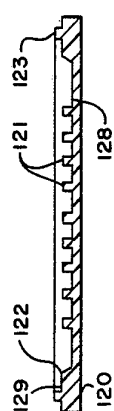


Fig-7A

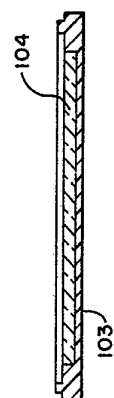


Fig-8



Fig-11

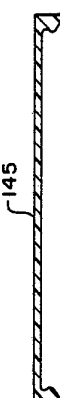


Fig-13

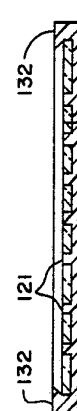


Fig-10



Fig-12

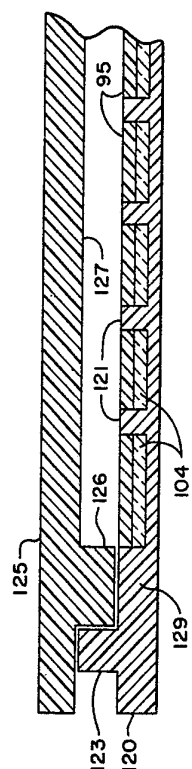


Fig-14

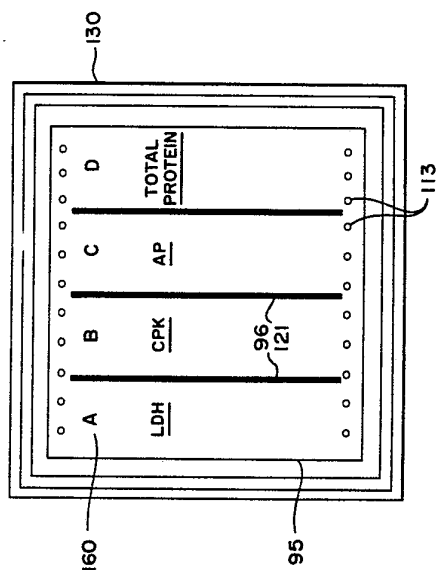


Fig-15

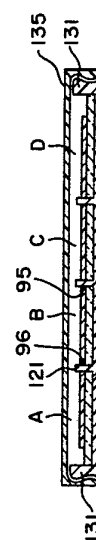
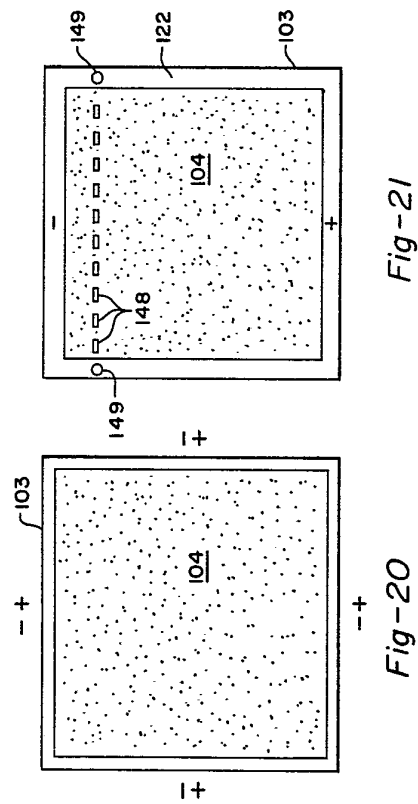
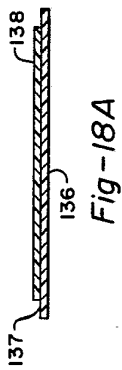
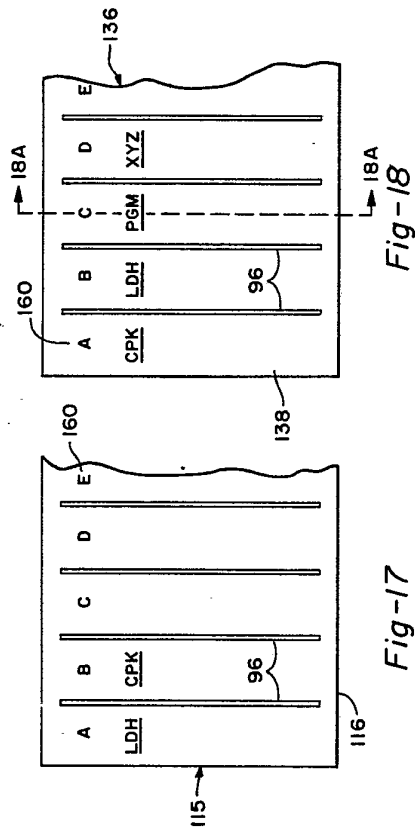
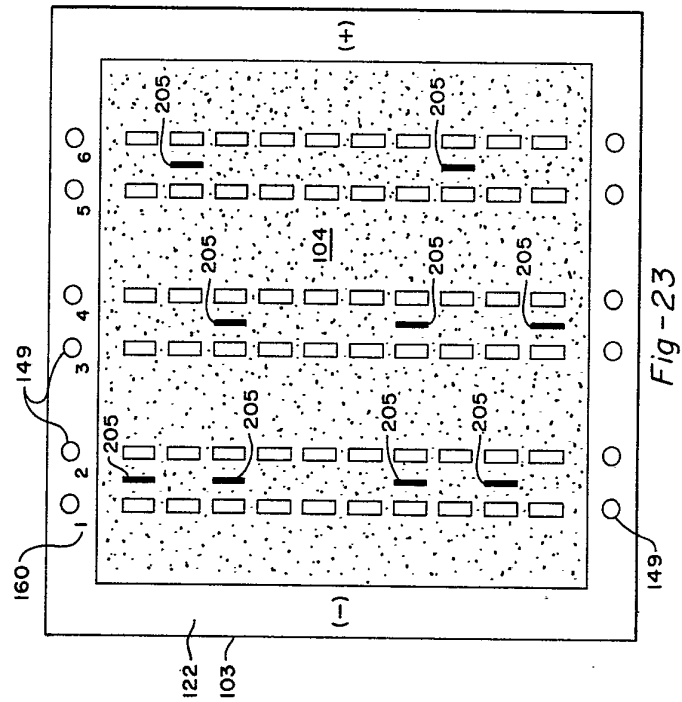
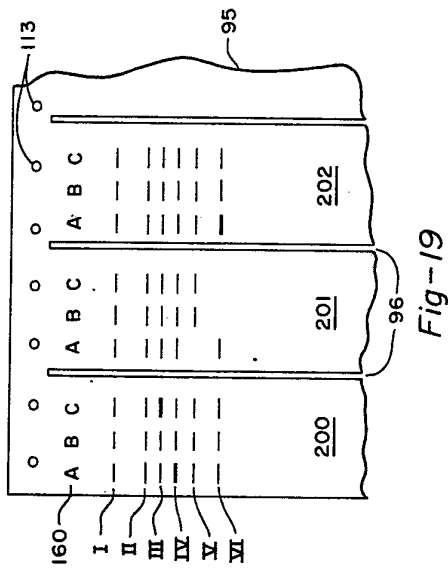


Fig-16



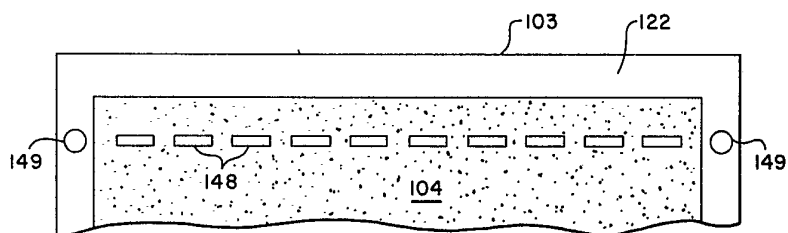


Fig-22

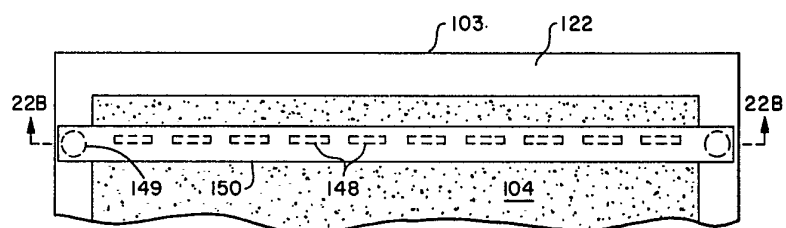


Fig-22A

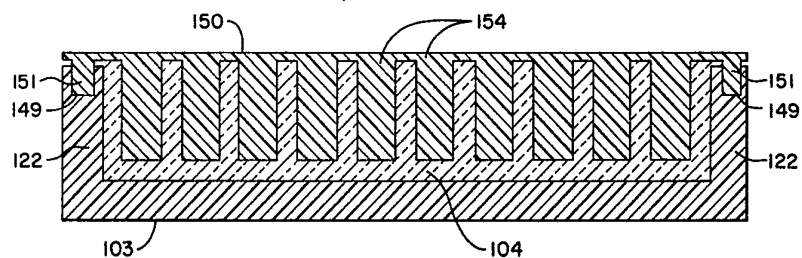


Fig-22B