

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:

2844-97

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **06. 03. 96**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **10.03.95, 10.03.95**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **95/402076, 95/402277**

(33) Země priority: **US, US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **14. 10. 98**
(Věstník č. 10/98)

(86) PCT číslo: **PCT/US96/03190**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 96/28538**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶:

C 12 M	1/00
C 12 M	1/40
C 12 G	1/00
C 12 G	1/68
G 01 N	21/76
G 01 N	33/543
G 01 N	33/567

(71) Přihlášovatel:

MESO SCALE TECHNOLOGIES, LLC.
CORPORATION SERVICE COMPANY,
Wilmington, DE, US;

(72) Původce:

Wohlstadter Jacob, Cambridge, MA, US;
Wilbur James, Rockville, MD, US;
Sigal George, Gaithersburg, MD, US;
Martin Mark, Rockville, MD, US;
Guo Liang Hong, Laurel, MD, US;
Fischer Alan, Cambridge, MA, US;
Leland Jon, Silver Spring, MD, US;

(74) Zástupce:

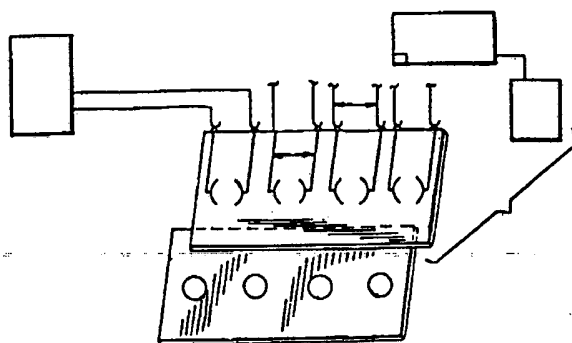
Čermák Karel Dr., Národní 32, Praha 1,
11000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Vícemístné multispecifické elektrochemi-
luminescenční testy**

(57) Anotace:

Strukturované vícemístné multispecifické povrchy, které jsou elektrochemiluminescenčně nabuzeny a určeny pro testy, založené na elektrochemiluminescenci, a způsoby výroby těchto povrchů. Způsoby chemicky a/nebo fyzikálně řízeného ukládání vodivých domén a reakčního činidla, které jsou použitelné při výrobě plochých zobrazovacích panelů a při provádění celé řady multispecifických postupů, a materiály, použitelné pro tyto účely. Zařízení pro detekci analytu elektrochemiluminescencí obsahuje dvě elektrody, které mají na svém povrchu imobilizováno reakční činidlo schopné vázat elektrochemiluminescenčně značené druhy nebo jejich partnery.



CZ 2844-97 A3

17.07.95

PV 2844-97

1

Vicemístné multispecifické elektrochemiluminescenční testy

Oblast techniky

Vynález poskytuje strukturované vicemístné multispecifické povrchy (dále jen PMAMS) určené pro testy, založené na elektrochemiluminescenčním jevu, a rovněž způsoby výroby a použití těchto PMAMS.

Dosavadní stav techniky

Tato přihláška je pokračováním související přihlášky číslo 08/402,076, podané 10. května 1995 a související přihlášky číslo 08/402,277, podané 10. května 1995.

V současné době existuje ekonomická potřeba, silně volající po rychlých a citlivých diagnostických technologiích. Diagnostické technologie jsou důležité pro celou řadu odvětví tržního hospodářství, zahrnujících péči o zdraví, výzkum, zemědělství, zvěrolékařství a průmyslový trh. Zvýšení citlivosti, zkrácení doby potřebné pro test, snadnější použití, zvýšení výkonu nebo snížení nákladů ~~otevívají zcela nové diagnostické možnosti na místech, kde~~ nebyly doposud známé diagnostické metody schopny splnit požadavky trhu. Určité diagnostické technologie mohou sice vykazovat vysokou citlivost, ale jsou příliš drahé na to, aby splnily potřeby trhu. Další technologie mohou být sice ekonomicky přijatelné, ale nemusí být pro určitá průmyslová odvětví dostatečně výkonné. Nová diagnostická technologie, která je schopna kombinovat tyto kvality, je pro diagnostiku velkým přínosem a příležitostí.

Pro diagnostické účely byla vyvinuta celá řada různých analytických technologií. Tyto technologie zahrnují značení pomocí radioaktivních izotopů, imunotesty, založené na navázání enzymů, chemické kolorimetrické testy, fluorescenční značení, chemiluminescenční značení a elektrochemiluminescenční značení. Každá z těchto technik v sobě spojuje unikátní kombinaci stupně citlivosti, snadnosti použití, výkonnosti, rychlosti a ceny, které definují a vymezují jejich použitelnost v různých diagnostických oblastech. Tyto difference jsou z části dány fyzikálními omezeními, které jsou vlastní každé technologii.

Radioaktivnímu značení není například vlastní robustnost, protože označení samotná se rozkládají a odstraňování konečného radioaktivního odpadu je tedy ekonomické.

Tržní využitelnost celé řady dnes používaných diagnostických technik je omezena zejména proto, že provádění testů vyžaduje dostatečně vyškolené techniky. V současnosti používané elektrochemiluminescenční postupy například nejen, že vyžadují odborně vyškolené techniky, ale rovněž zahrnují opakované promývání a přípravné kroky, které zvyšují jak finanční náklady, tak náklady spojené s odstraňováním odpadu. Nové diagnostické metody, které zjednodušují testovací postupy a snižují množství nákladů na test, jsou velmi důležité a představují možnosti pro další průmyslová odvětví, a stejně tak pro zvýšení výkonnosti v existujících oblastech.

Elektrochemiluminescenční testy

Jako „elektrochemiluminescence“ („ECL“) se označuje jev, při kterém elektricky excitované druhy emitují foton (viz například Leland a Powel, 1990 *J. Electrochem. Soc.* 137(10):3127-3131). Tyto druhy se označují jako ECL značení a zde rovněž jako TAG. Běžně používané ECL značení zahrnují organokovové sloučeniny, ve kterých se kov zvolí například z drahých kovů VIII skupiny, například organokovové sloučeniny obsahující ruthenium a osmium, jako Ru(2,2'-bipyridin)³⁺ skupina (rovněž označovaná jako „Rubpy“), popsána například Bardem a kol. (patent US 5,238,808). Světlo, generované ECL značeními, lze použít jako reporterový signál při diagnostických postupech (Bard a kol., patent US 5,221,605). ECL značení může být například kovalentně navázáno na vazebné činidlo, například na protilátku nebo nukleokyselinovou sondu. Komplex ECL značení a vazebného činidla lze použít pro testování celé řady látek (Bard a kol., patent US 5,238,808). Základ detekčních systémů, fungujících na bázi ECL, spočívá v detekování míry elektrického potenciálu, potřebného pro excitaci ECL značení za účelem emitace fotonu. Elektrický vlnový potenciál se aplikuje do ECL testovacího roztoku přes povrch elektrody, zpravidla kovový povrch a protielektrodu (viz například patenty US 5,068,088, 5,093,268, 5,061,445, 5,238,808, 5,147,806, 5,247,243, 5,296,191, 5,310,687, 5,221,605).

Pro provádění a detekování ECL reakcí jsou v současnosti dostupná, v daném oboru známá, zařízení. Například Zhang a kol. (patent US 5,324,457) popisuje příkladné elektrody, použitelné v elektrochemických člancích pro vodivé ECL. Levantis a kol. (patent

US 5,093,268) popisuje elektrochemické články použitelné pro provádění ECL reakcí. Kamin a kol. (patent US 5,147,806) popisuje zařízení pro provádění a detekování ECL reakcí včetně zařízení pro regulaci napětí. Zoski a kol. (patent US 5,061,445) popisuje zařízení pro provádění ECL reakcí včetně diagramů elektrického vlnového potenciálu pro vyvolání ECL reakcí, převaděčů digitálního signálu na analogový, kontrolního zařízení, detekčního zařízení a způsoby detekce proudu, generovaného ECL reakcí, na pracovní elektrodě a poskytující zpětnou informaci elektronickému kontrolnímu zařízení.

Přehled ECL technik podrobně uvádí například patent US 5,093,268. ECL technika, stručně řečeno, je způsob detekce objemu vzorku zjišťované látky, který se nachází ve vzorku v relativně malých koncentracích.

ECL zbytek, ve výše zmíněných, již udělených patentech, označený jako TAG, může nebo nemusí být navázán na zjišťovanou látku, ale v obou případech je vybuzen v důsledku celé řady chemických reakcí, které byly spuštěny přijmutím elektrické energie od pracovní elektrody do excitovaného stavu. Molekulou, která vybuzuje ECL TAG, je například oxalát nebo výhodněji tripropylamin (viz patent US 5,310,687).

Komerční ECL testy

Do současné doby se veškeré komerční ECL reakce prováděly na centimetrových elektrodových površích. Centimetrové elektrody představují kompromis mezi zvýšenou hodnotou ECL signálu, který je výsledkem větší elektrody a

požadavkem na snížení celkového objemu vzorku, nezbytného pro jednotlivé testy. Nicméně ani centimetrové elektrody nesplňují požadavky kladené na citlivost, kterou vyžaduje mnoho testů. Při pokusech vyřešit tento problém se u všech komerčních ECL systémů dále zvýšila citlivost použitím potažených magnetických patek, určených pro zachycení ECL zjišťované látky nebo reakční látky. Patky se následně umístily vedle pracovní elektrody, čímž se zvýší citlivost.

Použití magnetických patek má celou řadu omezení. Samotné patky jsou potaženy proteiny, které se časem svléknou a rozloží, což způsobí změnu signálu. Vzhledem k tomu, že manipulace a formátování těchto testů je složité, vyžadují komerční ECL diagnostické metody, aby se při každém testování prováděném na daném vzorku provedl komplexní sled po sobě jdoucích procedur, což prodlužuje dobu, potřebnou k provedení každého testu a zvyšuje náklady na tento test. Pětimikrometrové patky brání většině ECL TAG, navázaných na patkách, v dosažení tenké fólie, sousedící s pracovními elektrodami, což má za následek neúčinnost při excitaci ECL TAG.

Leventis a kol. (patent US 5,093,268) navrhuje způsob souběžného analyzování více než jednoho analytu použitím různých ECL značení pro jednotlivé analyty, přičemž každé značení emituje fotony při jiných vlnových délkách, a to v jediném testu. Nicméně tato technologie je omezena například nedostupností dostatečného počtu účinných ECL značení, vyzařujících při různých vlnových délkách, a potřebou optimalizovat chemické podmínky pro každé ECL značení. Tato praktická omezení brání komercializaci ECL detekčních systémů pro detekci více analytů, pracujících s více vlnovými délkami.

Dalším přístupem, použitým pro zvýšení citlivosti, je zlepšení technologie elektrody. Zhang a kol. (patent US 5,324,457) popisuje přímé ukládané fólie ECL druhů na různé kovové a polovodičové povrchy. Zhangova a Bardova technologie využívá úplného nasycení povrchu elektrody, což vede (jak popisují autoři) k nerovnoměrnému oblastnímu ukládání, které je pro vysoce citlivé testy nevhodné.

Dřívější metody, používané k provádění ECL testu, rovněž vyžadovaly čištění zkušebního článku včetně elektrod libovolnou metodou včetně použití ředěných kyselin, ředěných bází, detergentních roztoků atd., které jsou popsány například v patentu US 5,147,806.

Cílem vynálezu je tedy poskytnutí nového a co do nákladů ekonomického testu pro postupné nebo současné provádění množiny ECL reakcí a, ve výhodném provedení, poskytnutí zabudovaných kontrolních standardů pro zlepšení přesnosti.

Dalším cílem vynálezu je poskytnutí kazety, obsahující jednu nebo více jednorázově použitelných podložek vhodných pro současné nebo postupné provádění množiny ECL reakcí.

Dalším cílem vynálezu je poskytnutí způsobů a zařízení pro současné provádění množiny testů, analyzujících množinu analytů v jediném biologickém vzorku.

Podstata vynálezu

Vynález se týká kazety pro provádění ECL reakcí a testů, která zahrnuje množinu diskrétních vazebných, domén mobilizovaných na podložce, přičemž tyto diskrétní vazebné

17.07.98

7

domény jsou prostorově zarovnány s jedním nebo více elektrodovými a protielektrodovými páry. Tato kazeta výhodně zahrnuje první podložku, mající na svém povrchu množinu imobilizovaných diskrétních vazebných domén. Může obsahovat jeden nebo více elektrodových a protielektrodových párů. Elektrodové a protielektrodové páry jsou samostatně adresovatelné zdrojem elektrické energie ve formě napěťových vln, účinných pro spuštění elektrochemiluminescence. Kazeta může rovněž obsahovat druhou podložku, která může být umístěna vedle první podložky, a poskytnout tak prostředek pro umístění vzorku mezi těmito podložkami a/nebo může sloužit jako elektroda. Vazebné domény jsou na povrchu podložky uspořádány v určitém vzoru a jsou připraveny tak, aby navázaly stanovované složky nebo sledovaná reakční činidla.

Vynález se dále týká zařízení pro měření elektrochemiluminescence vzorku, který poskytuje podložku nebo prostředek pro manipulaci s kazetou, prostředek pro regulaci napětí, přizpůsobený pro nastavení vlnového napětí, potřebného pro spuštění elektrochemiluminescence, fotonový detekční prostředek pro detekování elektrochemiluminescence ze vzorku a prostředek pro manipulaci se vzorkem.

Vynález se dále týká způsobů použití kazet pro měření elektrochemiluminescence ve vzorku kontaktováním množiny vazebných domén kazety se vzorkem, který obsahuje množinu stanovovaných složek za ECL zkušebních podmínek a následným aplikováním vlnového napětí, potřebného pro spuštění elektrochemiluminescence, na každém z množiny elektrodových a protielektrodových párů a detekováním nebo měřením spuštěné elektrochemiluminescence. V širším slova smyslu se

17.07.98

dá říci, že vynález poskytuje ECL testovací metody, při kterých se vzorek nekontaktuje s elektrodou. Kromě toho, jako alternativu k použití elektrodových a protielektrodových párů, vynález počítá se scanováním elektrody a protielektrody nad vazebnými doménami.

Vynález rovněž poskytuje sady, obsahující složky zahrnující kazety, vhodné pro současné měření množiny elektrochemiluminescenčních reakcí, nosné povrchy, nad kterými se nachází množina imobilizovaných domén a média pro provádění chemických reakcí, které se použijí v rámci ECL testu.

Vynález rovněž poskytuje elektrody, připravené z grafitových mikroskopických trubiček.

Stručný popis obrázků

Obr. 1 znázorňuje dvě podložky, tvořící kazetu podle vynálezu, ve které se na podložce 10 nachází množina vazebných domén 14 a na podložce 12 se nachází množina odpovídajících elektrod 16, přičemž desky jsou umístěny tak, že se vedle každé vazebné domény nachází elektrodový pár;

obr. 1A znázorňuje dvě podložky, tvořící kazetu podle vynálezu, ve které se na podložce 10 nachází množina vazebných domén 14 a na podložce 12 se nachází množina odpovídajících elektrod 16, přičemž desky jsou umístěny tak, že se vedle každé vazebné domény nachází elektrodový pár;

17.07.98

obr. 2 znázorňuje dvě podložky, tvořící kazetu podle vynálezu, ve které se na podložce 26 nachází množina vazebných domén 30 v sousedství jednotlivých elektrod 32 tak, že při přiblížení podložek 26 a 28 se dostanou jednotlivé protielektrody 38 do sousedství vazebných domén 30;

obr. 3 znázorňuje dvě podložky, tvořící kazetu podle vynálezu, ve které má množina vazebných domén 48 na podložce 44 vedle sebe páry elektrody a protielektrody. Podložka 44 může být případně umístěna vedle podložky 46 a poskytnout tak prostředek, obsahující vzorek, vedle vazebných domén 48 a elektrod 50;

obr. 4 znázorňuje dvě podložky, tvořící kazetu podle vynálezu, ve které je množina vazebných domén 64 na podložce 60 uváděna do styku s vzorkem, u něhož se předpokládá, že obsahuje určovanou látku. Podložka 62 má oblasti 66, kontaktující reakční prostředí za účelem detekce nebo měření určované látky nebo provádění požadované reakce, takže přiblížení podložky 60 a 62 způsobí, že se vazebné domény 64 a oblasti 66 dostanou do vzájemného kontaktu;

obr. 5A znázorňuje půdorysný pohled na vazebné domény, uspořádané podle určitého vzoru, pro vícemístný multispecifický vazebný povrch. Geometrické tvary, trojúhelníky, čtverce a kruhy reprezentují vazebné domény, specifické pro různé určované látky. Tyto vazebné domény mohou být hydrofobní nebo hydrofilní. Povrch, obklopující tyto domény, může mít opačné vlastnosti (hydrofilní nebo hydrofobní) než vazebné domény, čímž se minimalizuje

rozšíření vazebných reakčních látek nebo určované látky z vazebných domén do okolí;

obr. 5B znázorňuje půdorysný pohled na mikroskopický vodič tekutin pro dopravu vazebných reakčních látek a/nebo určovaných látek k diskretním vazebným doménám. Jednotlivé kroužky představují průchody mikroskopického vodiče tekutin (například kapiláry);

obr. 5C znázorňuje bokorysnu pohled na mikrokrystalický vodič tekutin, ukazující přiblížení mikroskopického vodiče tekutin pro dopravu vazebných reakčních látek a/nebo určovaných látek k seskupení vazebných domén, uspořádaných podle určitého vzoru, při kterém jsou jednotlivé průchody vodiče zarovnány s diskretními vazebnými doménami, takže mikroskopický vodič tekutin může dopravovat k jednotlivým diskretním vazebným doménám různá vazebná reakční činidla;

obr. 6A znázorňuje přiblížení seskupení elektrod v zákrytu s povrchem, zahrnujícím seskupení multispecifických vazebných domén, rozmístěných podle předem stanoveného vzoru. Mezi skupinou elektrod a povrchem, zahrnujícím seskupení vazebných domén, je vložena odstranitelná ochranná bariérová deska, tvořící ochranu elektrod. Celá sestava tvoří kazetu pro provádění množiny ECL reakcí;

obr. 6B znázorňuje přiblížení seskupení zarovnaných pracovních elektrod a protielektrod. Tyto elektrody mohou mít tvar komplementární s vazebnou doménou nebo jakýkoliv jiný tvar (například vzájemně se prolínající);

obr. 7 znázorňuje boční pohled na přiblížené seskupení zarovnaných pracovních elektrod a protielektrod a

komplementární vazebný povrch, u kterého vodivé polymery rostou z povrchu elektrod přes mezeru mezi seskupením elektrod a vazebnými doménami tak, že dosahují potenciálního pole okolo ECL značení vzorku, čímž zvyšují účinnost ECL reakce;

obr. 8 znázorňuje boční pohled na přibližné seskupení zarovnaných pracovních elektrod a protielektrod a komplementární vazebný povrch, u kterého jsou vodivé částice vloženy mezi obě složky tak, že dosahují potenciálního pole okolo ECL značení vzorku, čímž zvyšují účinnost ECL reakce. Vodivé částice mohou být magnetické, aby umožnily snadnou manipulaci;

obr. 9 znázorňuje boční pohled na přibližné seskupení zarovnaných pracovních elektrod a protielektrod a komplementární vazebný povrch, ve kterém mají elektrody drobné výběžky, vybíhající do mezery mezi povrchem elektrody a vazebnými doménami tak, že dosahují potenciálního pole okolo ECL značení vzorku, čímž zvyšují účinnost ECL reakce;

obr. 10 znázorňuje boční pohled na přibližné seskupení zarovnaných pracovních elektrod a protielektrod a komplementární vazebný povrch, ve kterém povrchy nejsou paralelní, ale přizpůsobují se jeden druhému komplementárním způsobem;

obr. 11 znázorňuje bokorysný pohled na podložku, mající na sobě nanесenu kovovou vrstvu, čímž poskytuje sestavu jediné elektrody vazebného povrchu ve formě kazety. Na kovové vrstvě jsou podle určitého vzoru nanесeny samočinně sestavené monovrstvy (SAM);

obr. 12 znázorňuje bokorysný pohled na podložku, mající na sobě nanесenu kovovou vrstvu, čímž poskytuje sestavu jediné elektrody vazebného povrchu ve formě kazety. Na kovové vrstvě jsou podle určitého vzoru nanесeny samočinně sestavené monovrstvy (SAM) a mezi SAM, nanесenými podle určitého vzoru, jsou vloženy vodivé mikroskopické částice, které dosahují potenciálního pole okolo ECL značení vzorku za účelem zvýšení účinnosti ECL reakce;

obr. 13 znázorňuje bokorysný pohled na podložku, mající na sobě nanесenu kovovou vrstvu, čímž poskytuje sestavu jediné elektrody vazebného povrchu ve formě kazety. Na kovové vrstvě jsou podle určitého vzoru nanесeny samočinně sestavené monovrstvy (SAM) a z ECL značení roste vodivý polymer a/nebo vlákno, takže dosahuje potenciálního pole okolo ECL značení vzorku za účelem zvýšení účinnosti ECL reakce;

obr. 14 znázorňuje schéma podložky, obsahující seskupení elektrodových párů, řízených počítačem;

obr. 15 znázorňuje schéma podložky, obsahující seskupení elektrodových párů;

obr. 16 znázorňuje schéma podložky, obsahující seskupení elektrodových párů a počítačového systému pro řízení dodávky energie k jednotlivým elektrodovým párům;

obr. 17 znázorňuje schéma podložky, obsahující seskupení elektrodových párů a počítačového systému s množinou napěťových zdrojů a multiplexorů pro řízení dodávky napětí jednotlivým řízeným elektrodovým párům;

obr. 18 znázorňuje schéma podložky, obsahující seskupení elektrodových párů a počítačového systému s

množinou zapnutých napěťových zdrojů pro řízení dodávky napětí jednotlivým řízeným elektrodovým párům;

Obr. 19a až 19e znázorňují rovinné pohledy na několik alternativních kombinací elektrodových a protielektrodových párů;

obr. 20 znázorňuje podložku s úplným sendvičovým uspořádáním;

obr. 21 znázorňuje dva protilehlé PMAMS povrchy na podložkách;

obr. 22A znázorňuje uspořádání mikroskopických vodičů tekutin 2201 a fibrilové matrice 2200;

obr. 22B znázorňuje vazebné domény 2202;

obr. 23A znázorňuje zařízení pro přípravu fibrilové matrice vakuovou filtrací;

obr. 23B znázorňuje fibrilovou matici 2304 na filtrační membráně 2303;

obr. 24 znázorňuje použití válců k výrobě fibrilových matic;

obr. 25 schematicky znázorňuje vícevrstvou fibrilovou matici, jejíž horní vrstva obsahuje vazebné domény použitelné pro testy;

obr. 26 schematicky znázorňuje fibrilu, modifikovanou zbytky, které zvyšují nespecifickou vazebnost a několik zbytků, jak biologických tak nebiologických, které jsou navázány na jejím povrchu;

obr. 27 schematicky znázorňuje fibrilu, modifikovanou zbytky, které zvyšují nespecifickou vazebnost a několik zbytků, které jsou navázány na jejím povrchu, přičemž některé druhy se dále váží na ligandy;

obr. 28 znázorňuje několik druhů kovalentně navázaných na fibrile, přičemž některé druhy jsou dále navázány na další entity;

obr. 29 znázorňuje použití vícevrstvé fibrilové matrice jako optického filtru, který v závislosti na poloze světla na matici nebo uvnitř matrice umožňuje průchod světla a/nebo absorpci světla, a/nebo rozptyl světla;

obr. 30A znázorňuje cyklické voltamogramy pro elektrochemická měření, prováděná na elektrodách, tvořených maticí uhlíkových fibril;

obr. 30B znázorňuje cyklické voltamogramy pro elektrochemická měření, prováděná na elektrodách, tvořených zlatou fólií;

obr. 31 znázorňuje graf, porovnávající elektrochemické vlastnosti fibrilových matic v závislosti na tloušťce matrice a rychlosti scanování;

obr. 32 znázorňuje graf, který ukazuje, že nespecifická vaznost na fibrily se zpravidla zvyšuje s rostoucí koncentrací fibril v proteinovém roztoku;

obr. 33 ukazuje, že použití povrchově aktivních činidel může redukovat nespecifickou vaznost mezi proteinem, označeným pomocí ECL-TAG1, a uhlíkovými fibrilami;

obr. 34 schematicky znázorňuje pohled na experimentální článek, použitý pro měření elektrochemických vlastností a ECL, na elektrodě, tvořené fibrilovou maticí;

obr. 35 znázorňuje ECL signál, získaný při použití fibrilové matrice jako elektrody a 1000 pM TAG1 (plná čára) v roztoku, a signál, získaný z testovaného pufru (bez TAG1) (přerušovaná čára);

obr. 36 schematicky znázorňuje zařízení, obsahující dva PMAMS povrchy, ve kterém jsou dvě skupiny elektrod odděleny strukturovanou dielektrickou vrstvou;

obr. 37 znázorňuje zařízení s množinou vazebných domén 3702 na jedné podložce a elektrodou a protielektrodou na podložce druhé;

obr. 38 znázorňuje kazetu, ve které jsou vazebné domény umístěny na površích samostatných objektů, nesených na protielektrodě;

obr. 39 znázorňuje gel v kontaktu s pracovní elektrodou a protielektrodou;

obr. 40 znázorňuje graf ECL intenzity a cyklický voltamogram, získaný z ECL značeného gelu, který se nachází v kontaktu s pracovní elektrodou a protielektrodou;

obr. 41 znázorňuje graf ECL intenzity a cyklický voltamogram, získaný z ECL neznačeného gelu, který se nachází v kontaktu s pracovní elektrodou a protielektrodou;

obr. 42 schematicky znázorňuje dvoupovrchovou kazetu, použitou pro ECL;

obr. 43 ukazuje, že fibrilové matrice lze použít jako elektrody pro ECL komplexu protilátky-TAG1 adsorbovaného na těchto maticích;

obr. 44A znázorňuje ECL intenzitu proteinu, značeného pomocí TAG1, a imobilizovaného na elektrodě;

obr. 44B znázorňuje cyklický voltamogram potažené elektrody;

obr. 45A znázorňuje kvazi-reverzibilní, opakující se, generování ECL signálu z imobilizovaného proteinu, označeného pomocí ECL TAG1;

obr. 45B znázorňuje cyklický voltamogram potažené elektrody, naznačující částečnou ochranu potahového povlaku;

obr. 46A znázorňuje nevratné generování ECL signálu z imobilizovaného proteinu, označeného pomocí ECL TAG1;

obr. 46B znázorňuje cyklický voltamogram potažené elektrody, naznačující podstatnou ztrátu povlaku;

obr. 47 znázorňuje víceskupinové ECL zařízení a mikroprocesor, obsahující regulační prostředek pro generování a analyzování ECL signálů.

V širším slova smyslu vynález zahrnuje kazety určené pro provádění množiny elektrochemiluminescenčních testů. Tyto kazety sestávají z podložek, majících na sobě množinu vazebných domén, které jsou schopny specificky vázat jednu nebo více určených látek. Vazebné domény se připraví jako strukturované vícemístné multispecifické povrchy (dále jen

PMAMS) na podložce. PMAMS nabízí podstatné zlepšení pro již známé ECL testovací metody. Zvyšuje například četnost testů, které lze provádět a umožňuje množině různých testů rychlé nebo současné provedení. Kazety mohou zahrnovat množinu elektrod, které jsou schopny selektivně spouštět ECL emisi světla ECL označených reakčních látek, navázaných na vazebných doménách. Obr. 47 ukazuje víceřadé ECL zařízení, mající elektrody 4700, 4704 a matici 4702 s vazebnými doménami 4706 a mikroprocesorem, obsahujícím regulační prostředek 4720 pro generování a analyzování signálu, vedeného přes přívodní kabely 4710 až 4716.

U provedení vynálezu, znázorněného na obrázku 1, kazeta obsahuje dvě podložky 10, 12, přičemž na povrchu první podložky 10 se nachází množina vazebných domén 14 a na povrchu druhé podložky 12 se nachází množina elektrodových a protielektrodových párů 16. Vazebné domény a elektrodové a protielektrodové páry jsou v případě, že se první podložka 10 a druhá podložka 12 dají k sobě zarovnány tak, že každý pár z množiny elektrodových a protielektrodových párů 16 bude uspořádán vedle jedné z množiny vazebných domén 14. První podložka 10, ležící pod vazebnými doménami 14, tvoří výhodně PMAMS se zlatou fólií na povrchu a transparentními vazebnými doménami. Druhá podložka 12 je výhodně tvořena transparentní, rovnou umělohmotnou deskou, mající na sobě transparentní elektrodové a protielektrodové páry 16. Vazebné domény 14 jsou výhodně připraveny mikroskopickým nanesením organické samostatně sestavené monovrstvy (vrstva tvořená jednotlivými monomery) v určitém vzoru pomocí razítka na povrch podložky, přičemž uvedený monomer má biotinový nebo vazebný zbytek. Na odkrytý biotin se následně naváže avidin

nebo steptavidin (viz například patent US 5,093,268). Potom se nanesením diskrétního množství, vhodného biotinem, značeného vazebného reakčního činidla, například biotinem značené protilátky, která je schopna se selektivně vázat na stanovovanou látku, aplikují vazebná reakční činidla do oblastí na povrchu podložky, na která byla pomocí razítka nanasena monovrstva. Obr. 1A znázorňuje systém, tvořený kazetou (obr. 1) umístěnou v krytu 11.

U určitých provedení vynálezu je žádoucí reprodukovat imobilizovat specifikované, nebo-li předem stanovené množství jedné nebo více reakčních látek na povrchu. Imobilizace, obecně aplikovaná na libovolnou metodu, při které se reakční látka naváže na povrch, zahrnuje neomezujícím způsobem vytvoření kovalentní chemické vazby; nespecifickou adsorpci; sušení reakční látky na povrchu; elektrostatické interakce; hydrofobní a/nebo hydrofilní interakce; uvěznění nebo zachycení v kapalinách nebo gelech; biospecifické vazby (např. interakce mezi ligandem a receptorem nebo hybridizace oligonukleotidů); vytvoření vazeb mezi kovem a ligandem; chelatace a/nebo zapletení v polymerech.

Množství reakční látky, imobilizované na povrchu, může být předem určeno několika způsoby. Například množství reakčního činidla na povrchu lze specifikovat jedním nebo více objemovými a/nebo plošnými prvky, ve kterých je reakční činidlo přítomno. To lze rovněž specifikovat počtem jednotlivých molekul reakční látky, který lze specifikovat ve smyslu hustoty reakční látky v dané oblasti. Množství reakční látky lze specifikovat jako procento povrchu, nesoucí příslušnou reakční látku, a to buď ve vztahu k celkové ploše povrchu nebo k relativnímu množství dalších

reakčních látek přítomných na povrchu. Množství reakční látky lze rovněž definovat jako množství reakční látky, které musí být přítomno na příslušném povrchu, aby poskytl dostatečnou ECL intenzitu tak, aby test poskytoval požadovanou specifičnost. V konkrétním příkladu může být 1 cm^2 plochy zlatého povrchu potažen monovrstvou alkanthiolů.

Reakční látky mohou být rovněž reprodukovatelně imobilizovány na potažených površích. Povlak může sloužit ke zlepšení imobilizace určitých reakčních látek a/nebo ke snížení nežádoucí imobilizace dalších reakčních látek. Povrch může být zcela potažen nebo částečně potažen (potažení podle určitého vzoru). Povlak může mít jediné složení, nebo může obsahovat prvky, mající různé složení. V konkrétním případě může být povlak tvořen jednovrstvou fólií, nanesenou podle určitého vzoru, která v některých oblastech imobilizuje imunoglobulin G pomocí kovalentních chemických vazeb a brání jeho imobilizaci v ostatních oblastech.

Povlak může rovněž sloužit k předběžnému stanovení množství jedné nebo více reakčních látek imobilizovaných na povrchu v následných krocích nebo procesech. Alternativně lze množství příslušné reakční látky kontrolovat omezením množství reakční látky, která je uložena.

V případě povrchu, který má reakční látky (nebo povlak) imobilizovaný kvantitativním, reprodukovatelným způsobem, a který je tedy schopen kvantitativním a reprodukovatelným způsobem měřit ECL signál vzorku, je možné provést kalibraci.

Výhodně mají elektrodové a protielektrodové páry 16 velikosti menší než jeden centimetr a jsou vyrobeny společně s elektrodovými přívody 20 (např. transparentní kovová fólie) způsoby, které jsou známy jako způsoby výroby displejů, tvořených tekutými krystaly a elektrochromových displejů. Elektrodové přívody 20 jsou pomocí elektrických spojů 19 spojeny s generátorem 18 vlnového napětí. Výhodně jsou jednotlivé elektrodové a protielektrodové páry zásobovány samostatně za kontroly procesoru, takže lze na jednotlivé domény selektivně aplikovat elektrický potenciál. Úkolem světelného detektoru 22 a digitálního počítače 24 je zaznamenat a analyzovat výsledky v případě stimulace ECL emisí z vhodné látky, použité ke značení, navázané na vazebné doméně.

Obr. 1A znázorňuje systém, obsahující kazetu, elektrický přívod, vlnový generátor, prostředek pro detekci světla a digitální počítač, znázorněný na obrázku 1, umístěný v krytu 11. Kazeta se vkládá do krytu otvorem 15.

U dalšího provedení se používá jedna pracovní elektroda pro současné generování ECL signálu na množině vazebných domén. U tohoto provedení se ECL signál z každé vazebné domény identifikuje pomocí světelného zobrazovacího zařízení.

Obecně řečeno, testy, prováděné za použití kazet podle vynálezu jsou testy, které těží z použití množiny diskrétních vazebných domén. Použití těchto kazet například umožní rychlou a/nebo současnou detekci nebo měření celé řady určovaných látek. U výhodného provedení představují testy podle vynálezu ty testy, jejichž přínos vyplývá z použití reagenční látky, označené pomocí ECL, určované

látky a vazebného povrchu. ECL test podle vynálezu zahrnuje kontaktování množiny vazebných domén se vzorkem, o němž se předpokládá, že obsahuje určovanou látku, a spuštění ECL emise z vazebné ECL značící látky, přičemž ECL značící látka se nachází na určované látce nebo na konkurenční látce, na reakční látce, která se váže na určovanou látku nebo na množině vazebných domén.

Vynález rovněž poskytuje ECL testovací metody pro detekci nebo měření určované látky, který zahrnuje (a) kontaktování jedné nebo více domén z množiny diskrétních vazebných domén, která je imobilizována na povrchu jedné nebo několika podložek, se vzorkem obsahujícím molekuly navázané na elektrochemiluminescenční značící látce, přičemž uvedený vzorek nepříjde v průběhu kontaktujícího kroku do styku ani s elektrodou, ani s protielektrodou; (b) vnesení elektrody do blízkosti uvedené jedné nebo více domén z množiny vazebných domén; (c) aplikování napětové vlny, potřebné pro spuštění ECL na jedné nebo více doménách množiny vazebných domén; a detekování nebo měření ECL.

U dalšího provedení vynález poskytuje ECL testovací metody, při jejichž použití se (a) jedna nebo více domén z množiny diskrétních vazebných domén, která (i) je imobilizována na povrchu jedné nebo více podložek a (ii) je prostorově zarovnána s množinou elektrodových a protielektrodových párů a nachází se v jejich blízkosti, uvede do kontaktu se vzorkem, obsahujícím molekuly navázané na elektrochemiluminescenční značení; (b) přiblížení elektrody a protielektrody k uvedené jedné nebo více doménám z množiny diskrétních vazebných domén; (c) aplikování napětové vlny, dostatečné pro spuštění elektroluminescence na jedné nebo více doménách z množiny

vazebných domén; a (d) detekování nebo měření elektroluminescence.

Množina vazebných domén na povrchu může vzájemně reagovat se vzorky, které mají být testovány. PMAMS může být dále ve styku s roztoky, obsahujícími nezbytné reakční látky pro ukončení testu. Vazebný povrch se následně uvede do kontaktu (např. přitlačením) s povrchem komplementární elektrody (výhodně čisté nebo čerstvé elektrody), která se následně použije pro aplikování elektrického potenciálu, který bude stimulovat ECL.

U výhodného způsobu provádění testu, za použití zařízení z obrázku 1, se vzorek, u kterého se předpokládá, že bude obsahovat určovanou látku, aplikuje na vazebné domény 14 společně s reakčními látkami, značenými pomocí ECL, které jsou vhodné pro detekci určované látky. Podložka 11 a podložka 12 se následně sestaví tak, aby se každá z množiny vazebných domén 14 nacházela mezi elektrodou a protielektrodou jednoho z množiny elektrodových a protielektrodových párů 16 a vzorek se nacházel mezi nimi. Mělo by být zřejmé, že elektrodový a protielektrodový pár nepotřebuje mechanicky kontaktovat vazebnou doménu, aby došlo ke stimulaci ECL v případě, že se přes elektrodový a protielektrodový pár aplikuje vhodný potenciál. Elektrická potenciálová vlna, vhodná pro spuštění ECL emise, se vede přes elektrický spoj 19 z vlnového generátoru 18 do množiny elektrodových a protielektrodových párů 16. Libovolný signál, emitovaný ECL značením, nacházejícím se na vazebných doménách 14, je detekován světelným detekčním prostředkem 22 a zaznamenán a analyzován digitálním počítačem 24.

Vynález poskytuje způsob detekce v objemu vícesložkového kapalného vzorku množiny určovaných látek, které mohou být ve vzorku přítomny v různých koncentracích.

Obecně řečeno, množinu určovaných látek lze detekovat z multisložkového vzorku při molárních koncentracích nižších než 10^{-3} . Množinu určovacích látek lze výhodně detekovat z multisložkového vzorku při molárních koncentracích nižších než 10^{-12} .

Vynález poskytuje způsob detekování multisložkového vzorku, který lze provádět jako heterogenní testy, tj. testy, ve kterých je množina nenavázaných, označených reakčních látek separována od množiny navázaných, označených reakčních látek před tím, než se navázané, označené reakční látky exponovaly elektrochemickou energií, a homogenními testy, tj. testy, ve kterých se množina nenavázaných, označených vazebných látek a navázaných, označených reakčních látek společně exponovala elektrochemickou energií.

U testů podle vynálezu je elektromagnetické záření, použité pro detekování příslušné určované látky, odlišitelné od záření, odpovídajícího dalším určovaným látkám, identifikováním jeho pozice a/nebo místa jednoho nebo více znaků vzoru, přičemž tento vzor odpovídá vzoru vazebných domén v PMAMS.

U homogenního testu podle vynálezu se detekuje elektromagnetické záření, emitované navázanými označenými reakčními látkami buď jako zvýšení nebo jako snížení míry elektromagnetického záření v porovnání s elektromagnetickým zářením, emitovaným nenavázanými reakčními látkami nebo se detekuje elektromagnetické záření, emitované ze zdrojů,

odpovídajících v prostoru jednomu nebo více znakům, odpovídajícím vzoru vazebných domén v PMAMS.

U specifického příkladu způsobu podle vynálezu znázorněného na obr. 20, se sendvičový test provádí na podložku 5 s množinou vazebných domén BD na povrchu podložky, které jsou specifické pro navázání příslušné určované látky An. Jakmile se vzorek, u kterého se předpokládá, že obsahuje určovanou látku, aplikuje na vazebné domény, dojde k navázání určované látky na vazebné domény. Protilátky Ab, které jsou vhodné pro selektivní navázání určované látky An, označené pomocí ECL zbytku (TAG) za vzniku Ab-TAG, se následně aplikují na určovanou látku na vazebných doménách. Potom, co se přebytek nenavázané Ab-TAG vymyl z vazebných domén, se na TAG pomocí elektrod (nejdou znázorněny) aplikovala potenciálová vlna za účelem spuštění ECL emise z libovolného TAG na vazebných doménách. ECL signál se detekuje světelným detektorem a zaznamená digitálním počítačem (např. 22 a 24 na obrázku 1).

Další provedení, znaky a variace vynálezu ukáže níže uvedený popis.

Příprava vazebného povrchu

Pro lepší pochopení vynálezu následuje podrobnější popis přípravy vazebných domén na podložce. Množina vazebných domén, uspořádaná podle určitého vzoru na povrchu, který je specifický pro množinu určovaných látek, je zde označena jako strukturovaný vícemístný specifický povrch (multi-array multi-specific surface) neboli PMAMS.

PMAMS jsou připraveny na podložce, například navzorováním samočinně sestavitelných monovrstev (SAM) (Ferguson a kol., 1993, *Macromolecules* 26(22):5870 až 5875; Prime a kol., 1991, *Science* 252:1164 až 1167; Laibinis a kol., 1989, *Science* 245:845-847; Kumar a kol., 1984, *Langmuir* 10(5):1498 až 1511; Bain a kol., 1989, *Angew. Chem.* 101:522 až 528). Mezi metody povrchového vzorování lze rovněž zařadit použití fyzikálního leptání (například mikroobráběním) (Abbott a kol., 1992, *Science* 257:1380 až 1382; Abbott, 1994, *Chem. Mater.* 6(5):596 až 602), mikrolitografií (Laibinis a kol., 1989, *Science* 245:845 až 847), navázání chemických skupin na povrch chemikálií, aktivovatelných světelným zářením (Sundberg a kol., 1995, *J. Am. Chem. Soc.* 117(49):12050 až 12057) a mikrorazicí techniky (Kumar a kol., 1994, *Langmuir* 10(5):1498 až 1511; Kumar a kol., 1993, *Appl. Phys. Lett.* 63(14):2002 až 2004). Další metody povrchového vzorování zahrnují postupy prostorově řízeného dávkování tekutin nebo částic (např. ukládání pomocí mikropera (např. použití mikrokapalinového vodiče pro dopravu na povrch za použití X-Y přenosu)), mikrokapilární plnění (Kim a kol., 1995, *Nature* 376:581), technologie Ink-Jet nebo injekčního dávkovače. Pro vytvoření složitých povrchových vzorů lze použít kombinace těchto technik. Na obr. 5A je znázorněna podložka 600 s tvarově nezávislými vazebnými doménami, které jsou prezentovány, čistě jen pro ilustrační účely, geometrickými tvary 602, což naznačuje, že na jediné podložce mohou být přítomny vazebné domény, specifické pro různé látky. Povrch 604 mezi vazebnými doménami může být střídavě hydrofobní nebo hydrofilní, aby se vymeziло ukládání vazebného činidla za vzniku vazebných domén. Vazebné domény a/nebo povrch(y) mezi vazebnými doménami mohou mít sklon k nespecifickému

navázání nebo mohou být proti němu rezistentní a/nebo mohou mít tendenci k přichycení vazebných reakčních činidel přes kovalentní nebo nekovalentní interakce, nebo může být proti tomuto způsobu navázání rezistentní. V případě, kdy nespecifické navázání pomocí hydrofobních interakcí není žádoucí metodou pro přichycení vazebných chemikálií k povrchu, lze přidat detergent, který zabrání případnému vzniku nespecifických vazeb.

Šířka, nebo-li průměr, nebo-li nejširší rozměr vazebných domén činí 0,1 μm až 1 mm, v závislosti na geometrii domény. Povrchy jsou selektivně odvozeny tak, aby měly specifické vazebné složky exponovány, například ECL testovacím roztokem. Nespecifické interakce na vazebných doménách jsou redukovány za současného zachování specifických vazebných zbytků zabudováním zbytků, jakými jsou například polyethylenglykoly, na exponovaný povrch diskretních vazebných domén (Prime a kol., 1993, J. Chem. Soc. 115:10714 až 10721; Prime a kol., 1991, Science 252:1164 až 1167; Pale-Grosdemange a kol., 1991, J. Am. Chem. Soc. 113:12 až 20).

PMAMS mohou obsahovat 2 až 10^8 vazebných domén. Počet vazebných domén se výhodně pohybuje od 50 do 500. U ještě dalších provedení se počet vazebných domén pohybuje od 25 do 100.

Podložka může být vyrobena z celé řady materiálů včetně skla, umělé hmoty, keramické hmoty, polymerních materiálů, elastomerních materiálů, kovů, slitin, kompozitních vrstev, polovodičů, izolantů, silikonu a/nebo vrstvených materiálů atd.. Modifikované (funkcionalizované) elastomerní podložky lze připravit například způsobem

popsaným Fergusonem a kol., 1993, Macromolecules 26:5870 až 5875; Fergusonem a kol., 1991, Science 253:776 až 778; Chaudhury a kol., 1992, Science 255:1230 až 1232.

Povrch podložky, na kterém lze PMAMS připravit, může obsahovat různé materiály, například síta, plsti, vláknité materiály, gely, pevné látky (vyrobené například z kovu) elastomery atd.. Nosný povrch, nebo-li povrch podložky, může mít celou řadu různých strukturních, chemických a/nebo optických vlastností. Povrch může být například tuhý nebo pružný, rovný nebo deformovaný, transparentní, průsvitný, částečně nebo zcela reflexní nebo neprůhledný, a může mít kompozitní vlastnosti, oblasti s různými vlastnostmi, a může být kompozitem více než jednoho materiálu. Povrch může mít vazebné oblasti uspořádané podle určitého povrchového vzoru a/nebo oblasti, uspořádané podle určitého vzoru, ve kterých může probíhat katalýza podle vynálezu na jednom nebo více površích a/nebo adresovatelný svazek elektrod na jednom nebo více površích. Povrchy podložek mohou mít konfiguraci libovolných vhodných tvarů včetně rovinného, kulovitého, kuželovitého a válcovitého. U specifického provedení je podložkou, nesoucí PMAMS, tyčka. U dalšího provedení obsahuje podložka, nesoucí PMAMS uhlík, například grafit, sklovitý uhlík nebo saze.

U jednoho provedení obsahuje podložka, nesoucí PMAMS, jedno nebo více uhlíkových vláken. Tato vlákna mohou být tvořena amorfním nebo grafitovým uhlíkem. Může se rovněž jednat o uhlíkové mikrotrubičky, „buckeytube“ nebo členy „fullerenové“ rodiny.

U výhodného provedení podložka, nesoucí PMAMS, obsahuje jednu nebo více uhlíkových fibril (Hyperion

Fibrils) (patent US 4,663,230). Jednotlivé uhlíkové fibrily (jak uvádí patenty US 4,663,230, 5,165,909 a 5,171,560) mohou mít průměr přibližně 3,5 nm až 70 nm a délku větší než 10^2 násobek průměru, vnější oblast množiny v podstatě kontinuálních vrstev seřazených uhlíkových atomů adistinktní oblast vnitřního jádra. Pro ilustraci, typický průměr uhlíkových fibril se může pohybovat přibližně v rozmezí od 7 do 25 nm a typická délka v rozmezí od 1 μm do 10 μm .

Uhlíkové materiály mohou být použity ve formě agregátů. Jak popisuje patent US 5,110,693 a odkazy, zmíněné v tomto patentu, mohou dvě nebo více jednotlivých uhlíkových fibril tvořit mikroskopické agregáty zapletených fibril. Tyto agregáty mohou mít rozměry, pohybující se v rozmezí od 5 nm do několika cm. Pouze pro ilustraci, jeden typ mikroskopického agregátu („cukrová vata“, nebo-li „CC“) je tvořen vřetenem nebo tyčí zapletených vláken o průměru 5 nm až 20 μm a délce 0,1 μm až 1000 μm . Opět pro ilustraci lze uvést, že další typ mikroskopického agregátu fibril („ptačí hnízdo“, nebo-li „BN“) může být zhruba sférický s průměrem, který se může pohybovat v rozmezí od 0,1 μm do 1000 μm . Lze vyrobit i větší agregáty obou typů (CC a/nebo BN) nebo jejich směsi (viz níže).

Fibrily, které lze použít v podložce, zahrnují neomezujícím způsobem jednotlivé fibrily, agregáty jedné nebo více fibril, suspenze jedné nebo více fibril, disperze fibril, směsi fibril s dalšími materiály (např. s oleji, parafíny, vosky, polymery, gely, umělými hmotami, adhezivy, epoxidy, teflonem, kovy, organickými kapalinami, organickými pevnými látkami, anorganickými pevnými látkami,

kyselinami, bázemi, keramickými materiály, skly, pryžemi, elastomery, biologickými molekulami a médii, atd.) a rovněž jejich kombinace.

Fibrily mohou být v některých případech magnetické a v jiných případech nemagnetické. Míra, jakou jsou vyrobené fibrily magnetické nebo nemagnetické, je řízena množstvím katalyzátoru, který je obsažen ve fibrile v důsledku výrobního procesu fibrily. Takový výrobní způsob je například popsán v patentech US 4,663,230, 5,165,909 a 5,171,560. PMAMS jsou umístěny na, v nebo v blízkosti podložek, popsaných výše.

PMAMS lze generovat z různých typů povrchových vazebných skupin. Samočinně se sestavující monovrstvy, které lze použít za vzniku monovrstvy na povrchu, ke kterému jsou vázány, zahrnují neomezujičím způsobem alkanthioly (které váží zlaté a další povrchy), alkyltrichlorosilan (např. který váže křemík a oxid křemičitý), alkankarboxylové kyseliny (např. které váží oxidy hliníku) a rovněž jejich kombinace. Nejprve lze vytvořit monovrstvu a posléze použít vazebné chemie k přichycení vazebných reakčních látek. Modifikace, kterou lze provést potom, co se vrstva samovolně sestaví, poskytne dokonalejší ~~dvourozměrný krystalický potah monovrstvy na~~ povrchu podložky, který bude mít méně děr a defektů. Monomerní vrstva může být modifikována vazebnými reakčními činidly před nebo po samočinném sestavení. Pravidelné defekty v monovrstvě mohou být žádoucí a lze je získat modifikací prováděnou před tím, než se vrstva nebo nosný povrch samovolně sestaví. Pokud je modifikovaná skupina (například exponovaná vazebná skupina) na vazebné reakční

látky stericky velká, může tvořit těsně obalený povrch na exponovaném konci, ale s pravidelnými mezerami na kovovém povrchu. Tímto se dosáhne změny proudění, takže je dosaženo proudění skrze tyto pravidelné mezery ke zbytkům, označeným pomocí ECL, navázaným k části, kontaktující vzorkový roztok.

Příprava nekompletních monovrstev je v daném oboru známá. Další způsoby přípravy nekompletních monovrstev zahrnují neomezujícím způsobem generování monovrstev z ředěných roztoků vazebné reakční látky, ukončení reakce tvořící monovrstvu dokončením, poškození kompletnějších monovrstev radiací (např. iontovými částicemi), světelná nebo chemická reakční činidla. U jednoho provedení může opakované ražení bez namáčení razidla poskytnou množinu defektních monovrstev (Wilbur a kol., 1995, Langmuir, 11:825).

PMAMS může být generován na povrchu matric. Matrice mohou být značně vodivé, např. kovové elektrody nebo vodivé polymerní fólie; nebo mohou být izolanty; nebo polovodiči a/nebo středně vodivé. Materiálem matrice může být iontový vodič nebo porézní materiál. Tyto porézní materiály mohou být použity jako materiál podložky a/nebo materiál vodiče, a/nebo materiál filtru, a/nebo materiál kanálků (např. umožňujících průchod tekutin, iontových druhů apod.).

Porézní materiál lze kombinovat s dalšími materiály. Kompozitní struktury lze vyrábět z porézních materiálů spolu s dalšími porézními materiály, vodivými materiály, polovodičovými materiály, kanálkovými strukturami a/nebo roztoky (například iontové tekutiny). Těmito kompozity mohou být laminární struktury, sendvičové struktury a/nebo

vzájemně do sebe zasahující kompozity. Jako pevnou matici lze použít porézní materiál, nanesený na kovové elektrodě. Alternativně je porézní materiál vložen mezi vodivé materiály, polovodivé materiály nebo kombinaci polovodivých a vodivých materiálů. Jedna nebo více vazebných domén může být uspořádáno na jedné kontinuální desce, vyrobené z porézního materiálu a/nebo mohou být umístěny na množině diskretních objektů na podložce, na každém jedna nebo více vazebných domén. Povrch porézního materiálu (např. gel) může být plochý, hemisférický nebo může mít libovolný pravidelný nebo nepravidelný tvar, a/nebo mohou mít celou řadu fyzikálních vlastností (může být např. elastomerní, tuhý, nízkohustotní, vysokohustotní, s gradientem hustot, suchý, mokrá atd.) a/nebo optických vlastností (může být např. transparentní, průsvitný, neprůhledný, reflexní, refrakční atd.) a elektrických vlastností (může být např. vodivý, polovodivý, izolační, proměnlivě vodivý, například za vlhka vs. za mokra, atd.).

V matici lze vytvořit kanálkovou strukturu. Vrstvy, vyrobené z porézního materiálu, mohou být silné 5 až 2000 mikrometrů. Tyto vrstvy z porézních materiálů mohou být rovněž silnější než 2 mm.

Póry mohou procházet materiálem částečně a/nebo zcela, nebo mohou být součástí sítě pórů. Rozměry těchto pórů mohou dosahovat 5 nm až 10000 μm . U výhodného provedení má materiál některé póry s rozměry 20 nm až 50 nm a některé póry s rozměry od 0,5 μm do 100 μm .

Poréznost materiálu může být v celém materiálu konstantní nebo může růst, případně klesat, v závislosti na poloze v uvedeném materiálu. Materiál může mít celou řadu

pórů s různou velikostí, distribuovaných neorganizovaným a/nebo nahodilým způsobem.

Porézním materiálem může být kompozit více než jednoho materiálu.

Materiál může mít například některé póry dostatečně veliké na to, aby jimi prošly tak velké objekty, jakými jsou například biologické buňky, některé póry, kterými mohou procházet biologická média tak velká, jako proteiny nebo protilátky, některé póry, kterými mohou procházet pouze malé organické molekuly (molekulová hmotnost menší než 1000) a/nebo jejich kombinace.

Poréznost materiálu může být taková, že do tohoto materiálu, uvnitř tohoto materiálu a/nebo skrze tento materiál, může difundovat jedna nebo několik molekul, kapalin, pevných látek, emulzí, suspenzí, plynů, gelů a/nebo disperzí. Poréznost materiálu je taková, že biologická média mohou difundovat (aktivně nebo pasivně) nebo mohou být hnána některými prostředky do materiálu, uvnitř materiálu a/nebo skrze materiál. Mezi biologická média lze zařadit neomezujícím způsobem krev jako celek, frakce krve, plazmu, sérum, moč, roztoky proteinů, protilátek nebo jejich fragmentů, buněk, částic menších než buňka, virů, nukleových kyselin, antigenů, lipoproteinů, liposacharidů, lipidů, glykoproteinů, uhlohydrátů, peptidů, hormonů nebo farmaceutických činidel. Porézní materiál může mít jednu nebo více vrstev o různé poréznosti, takže biologická média mohou procházet například skrze jednu nebo více vrstev, ale nikoliv skrze další vrstvy.

Tyto porézní materiály mohou být schopny nést proud, způsobený prouděním iontových druhů. U dalšího provedení je

porézním materiálem porézní, vodou zbobtnaný, gel, například polyakrylamid nebo agar. Dostupná je rovněž celá řada dalších gelových kompozic (viz například Soane, D.S. *Polymer Applications for Biotechnology*; Soane, D.S., Ed., Simon & Schuster: Englewood Cliffs, NJ, 1992 nebo *Hydrogels in Medicine and Pharmacy*, sv. I-III; Peppas, N.A. Ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, 1987). Vazebné domény mohou být navázány na matrice kovalentními a nekovalentními vazbami. (Na toto téma bylo napsáno mnoho publikací, referátů a knih; některými z nich jsou například Tampion J. a Tampion M.D. *Immobilized Cells: Principles and Applications* Cambridge University Press: NY, 1987; *Solid Phase Biochemistry: Analytical and Synthetic Aspects* Scouten, W.H. Ed., John Wiley and Sons: NY, 1983; *Methods in Enzymology, Immobilized Enzymes and Cells*, Pt. B Mosbach, K. Ed., Elsevier Applied Science: London, 1988; *Methods in Enzymology, Immobilized Enzymes and Cells*, Pt. C Mosbach, K. Ed., Elsevier Applied Science: London, 1987; *Methods in Enzymology, Immobilized Enzymes and Cells*, Pt. C Mosbach, K. Ed., Elsevier Applied Science: London, 1987; viz také *Hydrogels in Medicine and Pharmacy*, výše). Protein lze například navázat na zesíťovaný kopolymer polyakrylamidu a N-akryloylsukcinimidu ošetřením roztokem proteinu. Vazebné domény mohou být rovněž integrovány do porézní matrice v kroku, který předchází polymeraci nebo zgelovatění. U jednoho provedení mohou být vazebné domény navázány na nezesíťované polymery pomocí celé řady vazebných chemických postupů. Polymery mohou být následně zesíťovány (například pomocí chemických metod, které zahrnují amidové vazby, disulfidy, nukleofilní útok na epoxidy, atd.) (viz například: Pollack a kol., 1980, J. Am. Chem. Soc. 102(20):6324 až 36). Vazebné domény mohou být navázány na

monomerní druhy, které se následně zabudují do polymerního řetězce během polymerace (viz Adalsteinsson, O., 1979, J. Mol. Catal. 6(3): 199 až 225). U ještě dalšího provedení mohou být vazebné domény zabudovány do gelů zachycením vazebných domén v pórech v průběhu polymerace a gelovatěním nebo prostupováním vazebných domén do porézní matrice a/nebo fólie. Kromě toho mohou být vazebné domény adsorbovány na povrchu porézních matric (např. polymerní gely a fólie) nespecifickou adsorpcí, způsobenou například hydrofilními a/nebo iontovými interakcemi. Biotin může být výhodně použit jako síťovací nebo vazebné činidlo. Avidin, streptavidin nebo další biotinová vazebná činidla mohou být zabudována do vazebných domén.

PMAMS lze generovat na porézních materiálech (například gelech) s různou velikostí pórů a obsahem rozpouštědla. Polyakrylamidové gely s různou velikostí pórů lze například připravit použitím různých koncentrací akrylamidu a různých stupňů zesítěvání.

Na PMAMS s velikostí pórů menší, než jsou rozměry určované látky, budou vazebné reakce probíhat v podstatě na povrch gelu. V tomto případě lze použít filtraci a/nebo elektroforézu skrze gel, pro koncentrování účinných látek na povrchu gelu, a modulování kinetiky (například zvýšení rychlosti) vazebné reakce. Rychlejší kinetika je výhodnější a znamená, že v kratším čase lze dosáhnout zvýšené citlivosti. V případě PMAMS s velikostí pórů větší, než jsou rozměry určované látky, mohou vazebné reakce probíhat na povrchu gelu a stejně tak uvnitř gelu. V tomto případě lze pro zvýšení kinetiky vazebných reakcí a odstranění nenavázaných druhů z povrchu použít filtraci a/nebo elektroforézu.

PMAMS, vytvořené na gelech, lze skladovat v mokřém stavu a/nebo suchém stavu a před použitím patřičně zvlhčit. Reakční činidla, potřebná pro ECL testy, mohou být zabudována do gelu před uložením (pronikáním do gelu nebo zabudováním během tvorby gelu) a/nebo mohou být přidány během testování.

Vazebné domény, uspořádané na PMAMS podle určitého vzoru, lze připravit aplikováním kapek a/nebo mikrokapek, obsahujících jednotlivé vazebné domény, do matrice v kapalně formě za vzniku substrátu. Převodu do pevného stavu a/nebo zgelovatění kapaliny lze následně dosáhnout použitím celé řady dobře známých technik (polymerace, zesítování, ochlazení pod teplotu zgelovatění, ohřátí). Činidla, která způsobují solidifikaci a/nebo zgelovatění, mohou být obsažena ve jmenovaných kapkách, takže v určitém okamžiku po dispergování tyto kapky ztuhnou a/nebo zgelovají. Pro dosažení solidifikace a/nebo zgelovatění lze použít následnou úpravu (například vystavení světlu, radiaci a/nebo redoxnímu potenciálu). U dalších provedení mohou být těmito kapkami nebo mikrokapkami suspenze, předpolymerační směsi, částicové skupiny a/nebo v podstatě pevné kapky. Dále lze použít ukládání parní fáze.

Vzorování lze rovněž dosáhnout vytvořením vrstvené struktury matic, z nichž každá obsahuje jednu nebo více vazebných domén. Agaróza, navázaná na protilátku (standardními chemickými postupy), může být například nalita do zásobníku a ochlazená, čímž se dosáhne jejího zgelovatění. Potom lze na tuto první vrstvu nalít další vrstvy, obsahující další protilátky a tyto vrstvy nechat opět zgelovatět. Řez touto vrstvenou strukturou poskytne kontinuální povrch, ve kterém je obsažena množina

distinktních vazebných domén. Tyto řezy lze naskládat na sebe a jejich rozříznutím vytvořit další PMAMS povrch s vyšší hustotou vazebných domén. Alternativně lze řadu matic, obsahujících daný vazebný prvek, položit vedle sebe a/nebo na sebe. Tyto struktury mohou být rovněž nařezány a použity jako PMAMS povrch.

Vzorování lze rovněž dosáhnout, pokud se využije výhodné schopnosti některých matic separovat se. Například směs nukleokyselinových sond by bylo možné separovat elektroforézou v polyakrylamidovém plátku generujícím povrch, obsahující množinu samostatných vazebných domén.

Pro přípravu PMAMS vazebných domén na podložce lze rovněž použít mikroskopické vodiče tekutin. Částečný výčet mikroskopických vodičů tekutin zahrnuje duté kapiláry, kapiláry plněné matricí (například porézním nebo rozpouštědlovým zbobtnaným médiem), pevné podložky, které mohou nést tenkou fólii nebo kapičku kapaliny. Kapiláry mohou být tvořeny pevnou látkou a reakční činidla mohou proudit po vnějším povrchu kapiláry. Zásobník reakční tekutiny může být vystaven poréznímu matricovému hrotu, který se uvede do kontaktu s PMAMS povrchem. Zásobník reakční kapaliny může být kontinuálně nebo periodicky plněn, takže daný porézní matricový hrot může opakovaně reprodukovatelně ukládat reakční činidla (například alkanthioly za vzniku monovrstev a/nebo vazebná reakční činidla, atd.). Pro regulaci toku reakčního činidla na povrch lze použít hrot s různou porézností. V množině kapilár mohou být přítomna různá nebo identická vazebná reakční činidla a/nebo může být množina distinktních vazebných činidel přítomna v jedné kapiláře. Kapiláry se uvedou do styku s PMAMS povrchem tak, že se určité povrchy

vystaví vazebným reakčním činidlům a vytvoří se diskrétní vazebné domény. Různá vazebná reakční činidla, z nichž každé je obsaženo v jiném mikroskopickém vodiči kapalin, se podle potřeby dopraví současně ze seskupení kapalinových vodičů na kovový povrch, například SAM povrch, atd.. Mikroskopické vodiče kapalin mohou být rovněž použity pro napouštění mikrorazítka požadovanou molekulou před aplikací této molekuly na povrch. Jednotlivé mikroskopické vodiče tekutin mohou být například použity pro aplikaci různých vazebných činidel, navázaných na zbytek, který podporuje adsorpci na povrch podložky (například volný thiol na uhlovodíkovém vazebném činidle, které podporuje adsorpci na zlato) za vzniku PMAMS. Takže například mikrorazítko napuštěné pomocí použitých mikroskopických vodičů tekutin protilátkami s různými specifitami, ve kterých je zabudováno vazebné činidlo s volným thiolem, lze použít pro aplikaci těchto protilátek na požadovaná místa na zlatém povrchu za vzniku diskrétních vazebných domén PMAMS.

Další způsob dopravy tekutiny podle určitého vzoru zahrnuje použití mikroskopických tiskařských zařízení, která dopravují mikroskopické kapky tekutiny vytlačením kapky skrze malý otvor (například tiskařské zařízení Ink-Jet). Vytlačování kapek u těchto zařízení může být způsobeno různými mechanizmy, které zahrnují ohřátí, elektrostatický náboj a/nebo tlak, vyvolaný piezoelektrickým zařízením. Vzorování více než jedné kapaliny lze provádět za použití více otvorů a/nebo jednoho otvoru a příslušného ventilového systému.

U jednoho způsobu přípravy PMAMS se pro diskrétní dopravu kapek, obsahujících požadovaná vazebná reakční činidla, do diskrétních oblastí na povrchu použijí

mikroskopické vodiče tekutin za vzniku diskrétních vazebných domén. Vazebná reakční činidla mohou obsahovat funkční vazebnou skupinu, která tvoří vazbu s chemickou skupinou na povrchu, na který se aplikuje. U dalšího řešení se vazebná reakční činidla, obsažená v kapce, nespecificky adsorbují nebo naváží na povrch (například sušení na povrchu).

Alternativně obsahují kapky, uložené na povrchu, reakční činidla, která mohou tvořit matrice. Touto matricí může být pevná látka, polymer nebo gel. Matrici je možné vytvořit odpařením rozpouštědla, zpolymerováním monomerních druhů, zesíťováním předem připravených polymerů, modulací teploty (například chlazením nebo ohřátím) a/nebo pomocí dalších způsobů. Polymerní druhy mohou být například ochlazeny snížením teploty nebo přidáním reakčního činidla, které způsobí gelovatění. Tvorba pevné matrice může být vyvolána generováním reakčních druhů na elektrodě (včetně substrátu), světlem (nebo dalším druhem záření), přidáním reakčních činidel, která indukují solidifikaci nebo gelovatění, ochlazením nebo ohřátím. Povrch může dále obsahovat katalyzátory, schopné iniciovat tvorbu matrice (například při gelovatění nebo polymeraci).

U výhodného způsobu hydrofilní a hydrofobní oblasti, které jsou uspořádány podle určitého vzoru, brání rozšíření aplikovaných tekutin nebo gelů. Tato tekutina nebo gel může obsahovat vazebná reakční činidla, která mají být navázána na povrch na podložce za vzniku vazebných domén PMAMS. V tomto případě použití těchto hydrofilních a hydrofobních ohraničených oblastí pomáhá umístit vznikající vazebnou doménu do diskrétní oblasti. Alternativně tekutina obsahuje reakční činidla, která mohou tvořit matrici na povrchu.

Vazebná reakční činidla se budou v případě uložení na povrch nacházet uvnitř definované oblasti. Hydrofilní a hydrofobní vymezení lze použít pro přesné umístění kapky do definované oblasti. Dále hydrofilní nebo hydrofobní oblasti mohou obsahovat skupiny, které mohou být zabudovány, například pomocí kovalentní nebo nekovalentní vazby, do matrice, čímž se dosáhne stabilnější adheze matrice k podkladu (Itaya a Bard, 1978, Anal. Chem. 50(11):1487 až 1489). U dalšího způsobu je aplikovanou tekutinou nebo gelem vzorek, obsahující určovanou látku, a tento vzorek se aplikuje na připravený PMAMS. U výhodného provedení lze pro uložení roztoku do diskretních oblastí použít kapiláry, obsahující hydrofilní roztoky, přičemž roztok, uložený do diskretních oblastí vytvoří diskretní domény, obklopené hydrofobními oblastmi. Alternativně lze použít hydrofobní vazebné domény, obklopené hydrofilními oblastmi, přičemž hydrofobní tekutina obsahuje vazebná reakční činidla nebo určovanou látku, případně látky. Výrazy „hydrofobní“ a „hydrofilní“ je třeba považovat za relativní ve vzájemném vztahu a/nebo ve vztahu ke vzorku, který má být aplikován. Pro řízené ukládání roztoku, za použití sestavy mikroskopických vodičů kapaliny, lze rovněž využít některých fyzikálních povrchových znaků (například jamek nebo kanálků na povrchu). Mikroskopický vodič kapaliny může být součástí kazety nebo může být výhodněji použit pro aplikaci specifických reakčních činidel na povrchu před použitím kazety.

Pomocí množiny razítek lze na tentýž nosný povrch aplikovat více než jednu vazebnou chemii a/nebo lze vytvořit povrch jak s hydrofilními, tak s hydrofobními vazebnými doménami. Oblast, ve které je žádoucí, aby se

hydrofilní vazebná doména nacházela v poloze 1 a hydrofobní vazebná doména v poloze 2, lze připravit následujícím způsobem. Nejprve se vytvoří hydrofilní otisk, který má kruh v poloze 1 a větší kruh v poloze 2. Potom se vytvoří hydrofobní otisk s kruhem v poloze 2, který přilne zevnitř ke kruhu monovrstvy hydrofilního otisku 1. Nakonec se povrch umyje hydrofobním roztokem složek monovrstvy.

PMAMS se generuje zejména mikroskopickým kontaktním tiskem, tj. razítkováním. Takto aplikovaná monovrstva je tvořena skupinou, vážící se k povrchu (například zlatému povrchu), přičemž výhodnou je thiolová skupina s alkanovým (například $(CH_2)_n$) mezerníkem. Mezerníková skupina se naváže (výhodně kovalentní vazbou) na vazebnou skupinu A. Vazebnou skupinou A může být například avidin, streptavidin nebo biotin, nebo libovolné další vhodné vazebné činidlo s dostupným komplementárním vazebným partnerem B. Vazba A-B může být kovalentní nebo nekovalentní a některé vazebné chemické mechanismy, které jsou v daném oboru známy, a které mohou být použity, popisuje například Bard a kol. (patent US 5,221,605 a 5,310,687). Vazebný partner B se dále naváže na vazebné činidlo, například protilátku, antigen, nukleovou kyselinu, farmaceutickou nebo další vhodnou látku pro vytvoření vazebné domény, která může být navázána na jednu nebo více určených látek ve vzorku, který má být testován. Vazebný partner B může být rovněž navázán na ECL TAG nebo značící látku. Vazebná skupina B může být dopravena na SAM pomocí kapiláry nebo sestavy mikroskopických vodičů tekutiny (obr. 5A až 5C), které jsou schopny navázat množinu reakčních činidel B s různými vazebnými povrchovými specifiky na monovrstvu A. Vazbu mezi A a B lze vytvořit před tím, než se naváže na monovrstvu.

Jak již bylo uvedeno, tvarově nezávislé vazebné domény jsou na obr. 5A znázorněny pouze pro ilustrativní účel, jako geometrické tvary 602. Tento obrázek naznačuje, že na jedné podložce 600 se mohou nacházet různá vazebná specifika. Obr. 5B znázorňuje půdorysný pohled na sestavu 606 mikroskopických vodičů tekutiny (například kapilár). Kolečka 610 znázorňují vodiče v řezu. Obr. 5C znázorňuje boční pohled na seskupení 608 mikroskopických vodičů tekutiny. Čáry, vybíhající seshora a zespoda, jsou jednotlivé mikroskopické vodiče 610 tekutin. Geometrické tvary 612 reprezentují specifické vazebné domény, vytvořené po dopravení vazebného reakčního činidla z každé jednotlivé kapiláry.

Po prvním orazítkování, popsaném výše, se holé povrchové (například zlaté) oblasti nechají zreagovat s druhým alkanthiolem, který nemá vazebný chemický mechanismus A, a v případě, že první výše popsaná monovrstva je hydrofobní, je tento druhý alkanthiol hydrofilní a naopak.

Vazebné reakční činidlo, které je specifické pro jednu určenou látku, může být použito pro všechny vazebné domény nebo lze použít vazebné reakční činidlo, které specificky váže množinu určených látek.

U další varianty může být nosný povrch orazítkován vícekrát materiály (například vazebnými reakčními činidly, ECL značkovacími látkami, SAM), které mají různé vazebné chemické vlastnosti a/nebo vazebné zbytky, jak ukazuje obr. 5A.

Vazebná reakční činidla, která jsou uspořádána do určitého vzoru, mohou být tvořena stabilními a/nebo

rozměrnými chemickými skupinami (přežívají za podmínek, kterým jsou vystaveny), které jsou později navázány na méně stabilní nebo rozměrné vazebné skupiny. Pro optimalizaci podmínek každého kroku při přípravě PMAMS povrchu a/nebo pro zjednodušení přípravy PMAMS roztoků lze použít celou řadu vazeb. První PMAMS povrch může být připraven generickým způsobem a následně modifikován tak, že vytvoří různé PMAMS povrchy. U dalšího provedení může být generický PMAMS povrch uveden do reakce s roztokem směsi reakčních činidel, která obsahují vazebné domény, směřující je přímo do příslušných oblastí (například vazebné domény) na PMAMS povrch. Vazebné domény, z nichž každá obsahuje jinou oligonukleotidovou sekvenci, se naváží podle určitého vzoru na povrch. Tento povrch se následně ošetří roztokem, obsahujícím směs sekundárních reakčních vazebných činidel, z nichž každé je navázáno na oligonukleotidovou sekvenci, komplementární k sekvenci na povrchu. Tímto způsobem lze vytvořit vzorování těchto druhotných vazebných prvků. Oligonukleotidovými sekvencemi jsou výhodně 6- až 30-mery DNA. Určité sady 6- až 30-merních sekvencí mohou obsahovat v podstatě podobnou sekvenční komplementaritu, takže daná sada má přibližně stejné vazebné konstanty pro hybridizaci a značně odlišné od méně komplementárních sekvencí. U dalšího provedení jsou sekundárními vazebnými prvky proteiny (například protilátky).

Způsoby, popsané pro inhibici, rozšiřování se aplikovaných reakčních činidel nebo vzorku na povrchu, které budou popsány níže, lze rovněž použít při přípravě PMAMS (a/nebo při aplikaci vzorku). Aplikované napětí (například z elektrodového a protielektrodového páru, lze použít pro další řízení ukládání a/nebo rozšiřování

reakčních činidel a/nebo vzorků (viz například Abbott a kol., 1994, Langmuir 10(5):1493 až 1497).

PMAMS vazebná reakční činidla mohou být umístěna na materiály, které obsahují uhlík. Rovněž mohou být umístěna na jednotlivých uhlíkových fibrilách nebo na agregátech jedné nebo více fibril. U celé řady provedení se mohou PMAMS vazebná činidla nacházet na suspenzích jedné nebo více fibril, disperzích fibril, směsích fibril s dalšími materiály a rovněž na jejich kombinacích.

PMAMS vazebná činidla mohou být umístěna na množině jednotlivých fibril a/nebo agregátů fibril, umístěných na podložce, v podložce nebo v její blízkosti. U jednoho provedení jsou vazebná reakční činidla umístěna na dispergovaných jednotlivých fibrilách nebo fibrilových agregátech. Tyto fibrily nebo fibrilové agregáty mohou být prostorově rozmístěny v samostatných doménách na povrchu a mohou tvořit vazebné domény, definované v této přihlášce vynálezu.

U dalšího provedení jsou tyto jednotlivé vazebné domény nebo množina těchto vazebných domén prostorově uspořádány v diskrétních oblastech podložky. Tyto jednotlivé vazebné domény nebo množiny vazebných domén mohou být umístěny v prohlubních, důlcích a/nebo otvorech v podložce. U ještě dalšího provedení jsou jednotlivé vazebné domény nebo množina domén obsaženy v kapkách vody, gelech, elastomerech, plastických hmotách, olejích atd., které se nacházejí na povrchu podložky. U ještě dalšího provedení mohou být jednotlivé vazebné domény umístěny na podložku pomocí povlaku (který může být vzorovaný), a který má různé

vazebné afinity pro různá vazebná reakční činidla a/nebo komplexy vazebného reakčního činidla a fibril.

Požadovaného umístění vazebných domén na množině jednotlivých fibril a/nebo agregátech fibril na podložce, lze dosáhnout pomocí jednoho nebo více mikroskopických vodičů tekutin (například kapilár). V množině nebo na množině mikroskopických vodičů tekutin mohou být přítomna rozdílná nebo identická vazebná reakční činidla a/nebo může být množina distinktních vazebných činidel přítomna na daném mikroskopickém vodiči tekutiny nebo v daném vodiči. Kapiláry mohou být uvedeny do kontaktu s podložkou (tvoření skvrn) a/nebo mohou dopravit reakční činidla, zatímco jsou buď mikroskopický vodič tekutiny a/nebo povrch vzájemně scanovány nebo přeneseny (tj. metodou využívající psací pero). Mikroskopický vodič tekutin může dopravit vazebná reakční činidla, nacházející se na fibrilách, na podložku tak, že se určité oblasti podložky vystaví komplexu nebo komplexům vazebného reakčního činidla a fibrily tak, že vytvoří diskrétní vazebnou doménu (domény). U výhodného provedení se různá vazebná reakční činidla, z nichž každé je přítomno v jiném mikroskopickém vodiči tekutin, dopraví souběžně ze sestavy vodičů na podložku. V jednom případě se vazebná reakční činidla a/nebo fibrily, na kterých se tato činidla nacházejí, modifikují chemickou funkční vazbou, která tvoří vazbu (např. kovalentní nebo nekovalentní interakci) s povrchem podložky. U některých provedení se vazebná reakční činidla a fibrily nespecificky naváží nebo adsorbují na povrch. U ještě dalšího provedení mohou být vazebná reakční činidla, nacházející se na fibrilách, dopravena do jamek, důlků a/nebo otvorů v povrchu podložky. U dalšího provedení se vazebná reakční činidla dopraví na

povrch, který je potažen materiálem, který má silnější nebo slabší vazebnou afinitu pro určitá vazebná reakční činidla nebo komplexy vazebného reakčního činidla a fibril, a tak se vytvoří domény reakčních činidel, které jsou lokalizovány prostorově a odděleně od dalších vazebných reakčních činidel.

Vazebná reakční činidla jsou lokalizována na jedné nebo více jednotlivých fibrilách, nebo agregátech fibril, které jsou magnetické. V takovém případě může magnetická podložka přitahovat vazebná reakční činidla, lokalizovaná na magnetických fibrilách k podložce.

Podložka může obsahovat několik oddělených oblastí, které jsou magnetické a jsou obklopeny oblastmi, které nejsou magnetické. Vazebná reakční činidla, lokalizovaná na magnetických fibrilách, mohou být lokalizována v magnetických oblastech podložky. U jednoho provedení může podložka obsahovat jednu nebo více oddělených oblastí, které jsou magnetické a jsou obklopeny oblastmi, které nejsou magnetické, a síla magnetického pole v magnetických oblastech může být modulována. U druhého provedení pomáhá použití takto modulovaného nebo sepnutelného magnetického pole fixovat nebo uvolnit vazebná reakční činidla, umístěná na fibrilách, z povrchu podložky, a tak mohou sloužit ke smísení uvedených domén.

Počet vazebných domén se pohybuje v rozmezí od 2 do 10^8 a výhodně od 25 do 500.

Vazebné domény se mohou nacházet na pracovní elektrodě a/nebo protielektrodě. Různá, zde popsaná, provedení pro

různé typy PMAMS, podložka elektrody a jejich konfigurace mohou být použity v kombinaci s ostatními.

PMAMS podložky mohou být chráněny (např. ochrannými povrchovými povlaky, sušením povrchu, balením za vakua nebo v inertní atmosféře, mražením a odvozenými metodami) pro pozdější použití.

Vazebná reakční činidla

Vazebné domény podle vynálezu se připraví tak, aby obsahovaly vazebná reakční činidla, která se specificky váží na alespoň jednu určovanou látku (ligand). Vazebná reakční činidla v diskrétních vazebných doménách se zvolí tak, aby vazebné domény vykazovaly požadovaná vazebná specifika. Jako vazebná reakční činidla lze použít libovolné, v daném oboru známé, molekuly, které jsou schopné nebo pravděpodobně schopné specificky vázat určovanou látku. Určovanou látku lze zvolit z níže uvedené části popisu, nazvané „ECL Assays That May Be Conducted”. Vazebná reakční činidla tedy zahrnují neomezuujícím způsobem receptory, ligandy pro receptory, protilátky nebo jejich vazebné části (např. Fab, (Fab)₂), proteiny nebo jejich fragmenty, nukleové kyseliny, oligonukleotidy, glykoproteiny, polysacharidy, antigeny, epitopy, buňky a buněčné složky, subcelulární částice, uhlohydrátové zbytky, enzymy, enzymové substráty, lektiny, protein A, protein G, organické sloučeniny, organokovové sloučeniny, viry, priony, viroidy, lipody, mastné kyseliny, lipopolysacharidy, peptidy, celulární metabolity, hormony, farmakologická činidla, sedativa, barbituráty, alkaloidy, steroidy, vitamíny, aminokyseliny, cukry, nebiologické

polymery, biotin, avidin, streptavidin, organické vazebné sloučeniny, například polymerní pryskyřice, lipoproteiny, cytokiny, lymfokiny, hormony, syntetické polymery, organické a anorganické molekuly atd.. Nukleovými kyselinami a nukleotidy se může rozumět DNA, RNA a/nebo nukleotidové analogy, zahrnující neomezuujícím způsobem oligonukleotidy, obsahující modifikované báze nebo modifikované cukry, oligonukleotidy, obsahující chemicky modifikovaný hlavní řetězec, modifikovaný jinými než fosfodiesterovými vazbami (viz například Nielsen, P.E. (1995) Annu Rev. Biophys. Biomol. Struct. 24 167 až 183) a/nebo oligonukleotidy, které jsou syntetizovány nebo modifikovány tak, že obsahují chemické skupiny, které lze použít pro navázání (kovalentní nebo nekovalentní) na další molekuly (kde definujeme nukleovou kyselinu nebo oligonukleotid, který obsahuje dvě nebo více bází nukleové kyseliny a/nebo derivátů bází nukleové kyseliny).

PMAMS podle vynálezu mohou obsahovat množinu diskrétních vazebných domén, jejichž součástí je alespoň jedna doména, obsahující vazebná reakční činidla, která jsou vzájemně identická a liší se specifickou vazebností od vazebných reakčních činidel, obsažených v dalších vazebných doménách, takže tento povrch umožňuje navázání různých určovaných látek na různé vazebné domény tohoto povrchu.

PMAMS obsahuje například vazebnou doménu, jejíž součástí je protilátka thyroidevého stimulačního hormonu (TSH), vazebnou doménu, obsahující oligonukleotid, který hybridizuje na vir hepatitidy C, vazebnou doménu, obsahující oligonukleotid, který hybridizuje na HIV vazebnou doménu, obsahující protilátku HIV proteinu nebo glykoproteinu, vazebnou doménu, která obsahuje protilátku

antigenu, specifického pro prostatu (PSA) a vazebnou doménu, která obsahuje protilátku viru hepatitidy B (HBV) nebo podsoubor těchto domén.

PMAMS může obsahovat množinu diskrétních vazebných domén, které obsahují alespoň jednu vazebnou doménu, ve které se nachází vazebná reakční činidla, lišící se vzájemně svou specifickou vazebností, takže jediná vazebná doména může navázat množinu určovaných látek. PMAMS například obsahuje vazebnou doménu, jejíž součástí je jak protilátka T buněčného antigenového receptoru, tak protilátka T buněčného povrchového antigenu, kterým je například CD4.

PMAMS může obsahovat množinu diskrétních vazebných domén, jejichž součástí je (i) alespoň jedna vazebná doména, která obsahuje vazebná reakční činidla, která jsou vzájemně identická, a která se svou specifickou vazebností liší od specifické vazebnosti alespoň jednoho dalšího vazebného reakčního činidla, obsaženého uvnitř dalších vazebných domén; a (ii) alespoň jedna vazebná doména, která v sobě obsahuje vazebná reakční činidla, která se liší svou specifickou vazebností. Například lze připravit PMAMS, který má (a) alespoň jednu vazebnou doménu, obsahující vazebná reakční činidla stejné identity (například protilátku T buněčného antigenového receptoru, jakou je α, β T buněčný antigenový receptor nebo γ, δ T buněčný antigenový receptor), což umožňuje alespoň jedné této vazebné doméně vázat všechny buňky exprimující tento T buněčný antigenový receptor; a (b) alespoň jednu vazebnou doménu, jejíž součástí jsou dvě rozdílná vazebná činidla, například protilátka T buněčného antigenového receptoru a protilátka CD4, takže umožní alespoň jedné této vazebné

doméně vázat $CD4^+$ T lymfocyty, exprimující T buněčný antigenový receptor (tj. subpopulaci T lymfocytů).

U dalšího provedení alespoň jedna vazebná doména obsahuje vazebná reakční činidla, která se liší typem molekul, ale která mají stejnou specifickou vaznost (například vazebná reakční činidla, jakými jsou epidermální růstový faktor a protilátka receptoru epidermálního růstového faktoru).

Množinu vazebných reakčních činidel lze zvolit tak, že ačkoliv jsou tato vazebná reakční činidla různá a mají různé specifické vaznosti, mohou určovat stejný analyt (u alternativního provedení jsou určovány různé analyty). Například pokud je analytem analyt, který má celou řadu vazebných zbytků (například buňka, která má různé povrchové buněčné antigeny), potom mohou různá vazebná reakční činidla, která se váží na různé vazebné zbytky, určovat stejný analyt. U dalšího provedení budou protilátky různých antigenů buněčného povrchu na jediné buňce určovat stejnou buňku. U ještě dalšího provedení mohou být použity protilátky různých epitopů jediného antigenu jako vazebná reakční činidla, určující tento antigen.

U ještě dalšího provedení jsou v jedné nebo více vazebných doménách přítomna vazebná reakční činidla, která se specificky váží na jedinou určovanou látku. Alternativně se v jedné nebo více vazebných doménách nachází vazebná reakční činidla, která specificky váží více, než jednu určovanou látku (například křížově reagující protilátka). V konkrétním případě lze jako konkrétní vazebná činidla použít ta vazebná činidla, která váží třídu určovaných látek, například činidla s podobnými vlastnostmi.

Vazebné domény lze rovněž zabudovat do PMAMS, jehož součástí jsou reakční vazebná činidla, specifická pro požadovaný standardní analyt, která se použijí jako vnitřní standard (například vazebná doména, která může být v kontaktu se vzorkem, obsahujícím definované množství analytu, na který se vazebná reakční činidla váží). Do PMAMS může být rovněž zabudována množina vazebných domén, obsahující reakční vazebná činidla, specifická pro stejný analyt (analyty), což umožní statisticky zprůměrovat získané analytické výsledky. Vazebná reakční činidla nemusí být specifická pouze pro stejný analyt, ale mohou být rovněž identická, takže budou označovat stejný vazebný zbytek na analytu. Může být tedy připravena množina vazebných domén, obsahující například 2 až 10^8 domén, která se bude specificky vázat na stejný vazebný zbytek, čímž se statisticky zprůměrují odečty ECL hodnot a zvýší se přesnost měření. Množina vazebných domén na PMAMS může být specifická pro kontrolní analyt nebo pro určovaný analyt, případně pro oba analyty na jediné podložce.

U dalšího provedení lze pro přípravu jedné nebo více vazebných domén použít známou počáteční koncentraci ECL značení. Vestavěná ECL vrstva slouží jako kontrola monitoru, například degradace značení a vlivů teploty.

Použitým vazebným reakčním činidlem může být enzym, specifický pro substrát (uvedeným substrátem je určovaná látka), ve kterém je produktem enzymatické reakce na substrátu reporterové činidlo (činidlo, které je detekovatelné), například produkt, který spouští ECL reakci, fluorescenční molekula, látka, která mění po uvedení do styku s vhodným enzymem barvu (například chromogenový substrát pro peroxidázu křenu polního). U

takového provedení je enzymem, použitým jako vazebné reakční činidlo, glukózodehydrogenáza (GDH), která může být použita pro detekování glukózy nebo měření koncentrace glukózy ve vzorku. ECL značení se nachází ve vazebné doméně, obsahující GDH nebo v její blízkosti. NADH, které je schopno reagovat s ECL značeními a podporovat ECL (Martin a kol., 1993, *Anal. Chim. Acta* 281:475), se připravuje působením enzymu na glukózu.

Vazebné domény, obsahující vazebná reakční činidla, která zvyšují vaznost pozadí (tj. která váží vazebný zbytek, obsažený v určované látce a stejně tak v ostatních analytech ve vzorku), lze použít pro zesílení signálu během detekce nebo měření ECL. Pokud je například určovanou látkou specifická buněčná subpopulace (například buňky CD4⁺) a vzorkem je kapalný vzorek (například krev), který obsahuje buňky pacienta, lze jako reakční vazebné činidlo, pro zvýšení vaznosti pozadí v podstatě ke všem buňkám ve vzorku, použít protilátku kyseliny sialové (protože kyselina sialová je součástí v podstatě všech glykoproteinů buněčného povrchu) a jako vazebné reakční činidlo lze použít protilátku buněčného povrchového antigenu, specifického pro buněčnou subpopulaci (například protilátku CD4) (v doméně, která obsahuje protilátku kyseliny sialové nebo v jiné doméně).

Napětová vlna

Napětová vlna (změna elektrického potenciálu v závislosti na čase), aplikovaná na množinu elektrodových a protielektrodových párů ECL článku, musí být dostatečná pro spuštění ECL reakce. Tato napětová vlna má zpravidla formu

rovnoměrného přeběhu, který má počátek na prvním napětí a pohybuje se ustáleně k druhému napětí, následně zpět přes první napětí ke třetímu napětí a konečně zpět proti prvnímu napětí. Vlna může například vycházet z hodnoty napětí, pohybující se v rozmezí od -0,5 přes 0,5 voltů, a pohybovat se ke druhé hodnotě napětí, která se pohybuje v rozmezí od 1 do 2,5 voltů, a zpět přes první hodnotu napětí ke třetí hodnotě napětí, která se pohybuje v rozmezí od 0,0 do -1 V. U dalšího provedení lze napětí ve formě jednodušších vln modifikovat od 0,0 do +3,5 a zpět k 0,0. Součástí napětových vln mohou být lineární spády, krokové funkce a/nebo další funkce. Napětové vlny mohou rovněž zabudovávat časové periody, ve kterých napětí zůstane fixováno na jednom potenciálu. Aplikovaný potenciál lze řídit ve vztahu k jedné nebo více referenčním elektrodám, nebo nemusí být použita žádná referenční elektroda. Kromě toho lze použít záporný potenciál. Bude tedy snadné zvolit napětí pro indukci ECL emisí z kazety podle vynálezu, s ohledem na optimální intenzitu ECL signálu, specificky pro ECL značení a testovací médium.

U některých aplikací se napětí výhodně mění společně s naměřeným světlem, emitovaným z vazebné domény. To je důležité zejména pro stanovení prahové hodnoty elektrického pole, potřebné pro vyvolání emitace světla na vazebné doméně. V tomto případě elektrický potenciál, aplikovaný na vazebnou doménu, začíná na hodnotě, o které se předpokládá, že je nižší než prahová hodnota, potřebná pro vysílání světla, a provede se první měření emitovaného světla. Pokud se žádné světlo nenaměří, pokud je naměřená hodnota světla nižší než předem stanovená prahová hodnota, potom se elektrický potenciál, aplikovaný přes elektronový pár, pod

kontrolou počítače, například pomocí počítačem řízeného napětového zdroje, zvýší a provede se další měření světla. Tento postup lze opakovat, dokud se nezíská předem určená hodnota světla. U tohoto způsobu lze aplikované napětí použít jako detekční signál.

ECL signál lze generovat z AC napětí, aplikovaného na elektrodové páry.

Pro odborníka v daném oboru, který je seznámen s napětovým a proudovým nastavením, které popisují patenty US 5,324,457 a 5,068,088, nebude obtížné zvolit optimální provozní napětí a napětový přeběh pro spuštění ECL emise.

Potenciál, potřebný pro generování ECL, může být generován osvětlením povrchu pracovní elektrody, pokud je pracovní elektroda polovodičem nebo pokud obsahuje další zbytek, který generuje elektrický proud v odezvě na světlo.

Adresovatelné elektrody a způsoby jejich použití

Pro adresování množiny elektrodových a protielektrodových párů lze použít celou řadu metod. Několik ilustrativních způsobů je znázorněno na obrázcích 14 až 18. Na těchto obrázcích jsou znázorněny čtyři elektrodové a protielektrodové páry 101, 102, 103, 104 a vlnový generátor, kterým je zpravidla digitální počítač, který rovněž slouží ke zpracování ECL, detekované detekčními prostředky.

Na obrázku 14 je každý pár 101 až 104 elektrody a protielektrody samostatně adresován páru spojnic, připojených k vlnovému generátoru. Spojnice 105, 106

vstupují do páru 101 elektrody a protielektrody. Příslušnou vlnovou délku lze aplikovat pomocí generátoru vlnové délky v libovolném daném okamžiku na libovolný pár nebo více párů spojnic, připojených k různým párům elektrody a protielektrody.

Obrázek 15 znázorňuje alternativní řešení, které se snaží redukovat počet spojů, potřebných pro adresování elektrodových párů, znázorňuje řádkové a sloupcové přístupové schéma pro dodávání napětí všem elektrodám nebo některým z těchto elektrod. V tomto schématu se jedna z elektrod 201, 202 v každém sloupci množiny párů elektrody a protielektrody připojí ke společnému elektrickému vodiči 205 na podložce 200, a každá z protielektrod v každé řadě množiny párů elektrod a protielektrod se spojí s vodičem 207, 208 na podložce 200. Vodiče 205, 206 se připojí ke spojům C1, resp. C2, na straně podložky 200 a vodiče 207, 208 se připojí ke spojům R1, resp. R2. Každé z těchto spojení se následně připojí samostatnou linkou na vlnový generátor. U uspořádání znázorněného na obrázku 15 se počet potřebných spojů a signálových linek z vlnového generátoru zredukoval, v porovnání s řešením znázorněným na obrázku 14, z 8 na 4.

Pro rychlé a postupné zásobování jednotlivých elektrodových párů energií je prospěšné spínací zařízení, řízené počítačem. Obrázek 16 ukazuje množinu elektrod, připojených k prvnímu multiplexoru 310. Množina protielektrod je připojena ke druhému multiplexoru 320. První multiplexor je rovněž připojen k prvnímu pólu napětového zdroje 330, který zpravidla dodává níže popsany, časově se měnící, elektrický potenciál. Druhý multiplexor

je rovněž připojen k druhému pólu napětového zdroje. Použitím adresovacích linek A0-A3, elektricky připojených ke všem multiplexorům a ke střadači 340, může počítačový procesor 350 směřovat multiplexory tak, aby selektivně napojily všechny první elektrody, nebo některé z nich, na první pól napětového zdroje, a všechny druhé elektrody ke druhému pólu zdroje napětí.

Jak ukazuje obrázek 17, množina napětových zdrojů je připojena přes samostatné sady multiplexorů k jednotlivým elektrodám. V případě, že je žádoucí generovat na příslušném elektrodovém páru první elektrický potenciál nebo rozmezí elektrických potenciálů, potom se multiplexory 410 a 420, spojené s napětovým zdrojem 430, poskytující tento potenciál, adresují pomocí počítačového procesoru 350 zpravidla přes střadač 340, čímž se spojí zdroj tohoto příslušného napětí s uvedeným elektrodovým párem. Pokud je žádoucí vytvořit pro další elektrodový pár jinou hodnotu elektrického potenciálu nebo rozmezí elektrických potenciálů, potom se počítačovým procesorem adresují multiplexory 440, 450, spojené s jiným zdroje 460 napětí, čímž se připojí tento zdroj napětí přes multiplexory 440, 450 ke zmíněnému elektrodovému páru. Pokud má seskupení elektrod v tomto provedení část elektrodových párů, které mohou být nezávisle buzeny, může být, jak ukazuje obrázek 14 nebo 15, jeden elektrodový pár buzen jedním napětovým zdrojem, zatímco druhý elektrodový pár může být současně buzen dalším napětovým zdrojem. Alternativně lze dva napětové zdroje z obrázku 17 nahradit jediným napětovým zdrojem, paralelně připojeným k oběma sadám multiplexorů, což umožní, aby byly oba napětové páry buzeny z jednoho napětového zdroje.

Namísto dvou sad multiplexorů pro oba napěťové zdroje, které znázorňuje obrázek 17, lze použít množinu napěťových zdrojů 520, 530, jak ukazuje provedení na obrázku 18. Tyto napěťové zdroje lze připojit přes počítačem řízený elektrický spínač 510 nebo spínače k jediné sadě multiplexorů 310, 320. Jak ukazuje obrázek 18, počítač by mohl řídit spínač 510 tak, aby připojil příslušný napěťový zdroj k multiplexorům a multiplexory (signalizováním jejich adresových spojů A0-A3) tak, aby spojily zvolený zdroj napětí s požadovaným elektrodovým párem.

Alternativně lze měnit elektrický potenciál, aplikovaný na každý elektrodový pár v libovolném provedení. To je užitečné zejména v případě, kdy se použije kazeta, obsahující množinu různých vazebných domén. Tato kazeta může vyžadovat vytvoření různých rozmezí elektrických potenciálů na různých vazebných doménách. Součástí vynálezu je několik různých provedení, schopných měnit elektrický potenciál, aplikovaný na jednotlivé elektrody.

Výhodně lze použít napěťový zdroj, řízený počítačem. Počítačem řízený napěťový zdroj je zdroj, který může být adresován počítačem, s cílem zvolit příslušný elektrický potenciál, který má být aplikován na elektrody. Alternativně může být naprogramován tak, aby postupně aplikoval, v předem stanoveném časovém intervalu, příslušné rozmezí elektrických potenciálů. U tohoto systému jsou adresové linky elektricky spojeny s počítačem a napěťový zdroj umožní počítači programovat napěťový zdroj tak, aby produkoval příslušný elektrický potenciál, který má být aplikován na příslušný elektrodový pár.

Lze použít i další způsoby adresování množiny elektrodových párů. V blízkosti každého páru elektrody a protielektrody lze například umístit množinu referenčních elektrod, která bude snímat napětí, aplikované na tento pár. Tímto způsobem se může zajistit dodatečná kontrola napěťové vlny.

Obrázek 36 znázorňuje další provedení vynálezu, ve kterém každý ze dvou povrchů (3602, 3603) nese seskupení elektrod (3600, 3601), které jsou odděleny mezerami v izolátoru 3604, uspořádaných podle určitého vzoru (například umělohmotnou fólií s vyraženými otvory 3605). Každá elektroda může sahat přes množinu mezer. Pokud se elektrický potenciál aplikuje vždy na jednu elektrodu na každém povrchu, potom může proud procházet pouze přes mezeru, kontaktující obě elektrody, čímž se omezuje oblast, ve které mohou probíhat elektrochemické reakce. U výhodného provedení, znázorněného na obrázku, mohou být elektrody (3600, 3601) uspořádány na podložce v řadách. Tyto dvě sady elektrod, na zmíněných dvou površích, jsou orientovány kolmo na sebe. Mezery v izolující vrstvě se nacházejí pouze v průsečíku elektrod těchto povrchů.

Výhodou tohoto provedení oproti jednotlivě adresovaným elektrodovým párům je potřeba menšího množství elektrických vodičů.

U alternativního provedení lze izolant 3604 vynechat a povrchy umístit do těsné blízkosti tak, aby mezi nimi existovala pouze úzká mezera. U tohoto provedení potenciál, aplikovaný mezi elektrody na jednotlivých površích, výhodně způsobí, že proud bude procházet přes průsečík elektrod

(tj. minimální vzdálenost mezi elektrodami), čímž se omezí oblast, ve které mohou probíhat elektrochemické reakce.

Světelná detekce

Světlo, generované spuštěnou ECL emisí, se detekuje vhodným světelným detektorem nebo detektory, umístěnými vedle zařízení podle vynálezu. Světelným detektorem může být například film, fotonka s násobičem, fotodioda, lavinová průletová dioda, integrovaný obvod s vazbou nábojem („CCD“) nebo další světelný detektor, případně kamera. Světelný detektor může být jediný detektor pro detekování postupných emisí nebo množina detektorů pro detekování prostorově rozptýlených souběžných emisí, při jedné nebo více vlnových délkách emitovaného světla. Emitovaným a detekovaným světlem může být viditelné světlo nebo neviditelné záření, například infračervené nebo ultrafialové záření. Detektor nebo detektory mohou být stacionární nebo pohyblivé. Emitované světlo nebo další typy záření mohou být vedeny do detektoru nebo detektorů pomocí čoček, zrcadel a světelných vodičů na bázi optických vláken (jednoduchých, vícečetných, fixovaných nebo pohyblivých), umístěných na vazebném povrchu kazety nebo vedle tohoto povrchu. Detektory mohou případně světlo přijímat přímo. Samotné podložky PMAMS a elektrodové povrchy lze rovněž využít jako vodiče nebo přenašeče světla.

PMAMS lze vytvořit na povrchu seskupení světelných detektorů tak, aby každý světelný detektor přijímal světlo pouze z jediné vazebné domény. Seskupením světelných detektorů může být CCD čip a vazebné domény mohou být

navázány (za použití standardních chemických vazeb) k povrchu polovodičového zařízení.

Kapky, uložené na vazebných doménách nebo na druhém povrchu, případně v jeho blízkosti, lze použít jako mikročočky pro směřování nebo řízení emitovaného světla. Světelný detektor se může nacházet přímo před kazetou a namísto světelného vodiče lze pro vedení světla z libovolné domény množiny vazebných domén k detektoru použít různá, světlo zaostřovací zařízení, například parabolické reflektory nebo čočky. Světlo, emitované alespoň ze dvou vazebných domén, lze měřit současně nebo postupně.

Chyba, způsobená změnou teploty, stárnutím zařízení nebo elektrickým šumem samotných světelných detektorů, může být kontrolována „střídačovým“ zařízením mezi zařízením pro měření světla a měřenou vazebnou doménou. Střídačem může být libovolný, běžně používaný mechanický střídač, který je odborníkům v daném oboru dobře znám, například rotační kotouč se štěrbinami nebo výřezy, které umožňují průchod světla. Alternativně lze světlo střídat pomocí LCD klapky, seskupení LCD klappek, světelného ventilu nebo ventilů z pevného materiálu. Toto rovinné seskupení LCD klappek nebo světelných ventilů z pevného materiálu lze řídit pomocí počítače. Tato zařízení jsou výhodně uspořádána mezi rovinou kazety a světelným vodičem nebo vodiči, nebo zařízeními, zaostřovacími světlo, která směřují světlo z vazebných domén do světelného detektoru. U jednoho provedení se klapka nachází nad každou z vazebných domén. Pokud se použije LCD klapka nebo světelný ventil, potom mohou být tyto klapky modulovány tak, aby při různých frekvencích současně poskytovaly pro různé, světlo emitující, vazebné domény různé rychlosti přerušování. Při

použití této techniky lze současně měřit množinu různých světelných signálů. Pro rozdělení jednoho elektrického signálu na několik elektrických složek, z nichž každá odpovídá jedné z množiny jednotlivých světelných složek, lze použít elektronickou pásmovou propust, elektricky připojenou ke světelnému detektoru. Výše popsáním přerušováním světla nebo použitím dalších, v daném oboru známých mechanismů, lze vytvořit světelnou vlnu střídavého proudu, která umožní elektronicky odfiltrovat šumovou složku střídavého proudu.

ECL signál může být kalibrován porovnáním již získaných výsledků s výsledky pro standardní reakční činidla a provedením korekce signální modulační odečtením výsledku pro reakční činidlo.

Analýza ECL signálu

Signály, které poskytuje daná vazebná doména, mohou představovat rozmezí hodnot a tyto hodnoty se v závislosti na kvantitativním měření převedou na „analogový“ signál. Dalším měřením se získá z každé domény „digitální“ signál, který oznamuje, že uvedená určovaná látka je ve vzorku přítomna nebo nepřítomna.

Pro obě techniky se použije statistická analýza, která je zvláště užitečná pro translaci množiny digitálních signálů a pro získání kvantitativních výsledků. Nicméně některé určované látky vyžadují digitální signál, který označuje přítomnost, případně nepřítomnost této určované látky, a který označuje mezní koncentraci této látky. „Analogové“ a/nebo „digitální“ formáty lze použít

samostatně nebo v kombinaci. Další statistické metody mohou využívat PMAMS, například je možné na povrchu vytvořit koncentrační gradienty PMAMS (Chaudhury a kol., 1992, *Science* 256:1539 až 1541). Tato technika se používá pro stanovení koncentrací a využívá statistickou analýzu vazebnosti na koncentračním gradientu. Množina lineárních seskupení PMAMS s koncentračními gradienty může být tvořena násobením různých specifických vazebných činidel. Koncentrační gradienty mohou být tvořeny diskrétními vazebnými doménami, obsahujícími různé koncentrace reakčních vazebných činidel.

Přítomnost kontrolních testovacích systémů na vazebném povrchu kazety je rovněž důležitá pro objektivnost všech provedených analýz, které by mohly být narušeny proměnou signálu, způsobenou například poškozením nebo stárnutím kazet a dalších složek, kolísáním jejich provozu, změnami teploty, šumem elektrického obvodu, šumem fotodetekčního zařízení atd.. Pro stejný analyt lze například použít množinu redundantních vazebných domén (obsahujících stejná vazebná reakční činidla nebo různá vazebná reakční činidla, která jsou specifická pro stejnou určovanou látku). U dalšího provedení lze použít analyty o známé koncentraci nebo kontrolní domény PMAMS, které jsou kovalentně navázány na známé množství ECL značení nebo známé množství ECL značení v roztoku.

Testy, prováděné způsobem podle vynálezu, budou rychle a účinně shromažďovat velká množství dat, která lze ukládat například ve formě databáze, tvořené kolekcí klinických informací nebo informací, týkajících se výzkumu. Shromážděná data lze rovněž použít pro rychlou soudní nebo personální identifikaci. Například použití množiny

nukleokyselinových sond, pokud se vystaví vzorku lidské DNA, mohou být použity pro označení DNA otisku prstu, který lze snadno použít pro identifikaci klinických nebo zkoumaných vzorků.

Příprava seskupení množiny elektrod

Šířka nebo průměr elektrod se může pohybovat od 0,001 do 10 mm. U výhodného provedení se rozměr (šířka nebo průměr nebo nejširší rozměr v závislosti na geometrii elektrodových párů) elektrodových párů pohybuje od 0,01 do 1 mm.

Výhodně se elektrody vyrábí z vhodných vodivých materiálů, například transparentních kovových fólií nebo polovodičů (například zlato, resp. indium-oxid titaničitý), které jsou dobře známy v daném oboru, například pro výrobu displejů, tvořených tekutými krystaly apod.. V sestavené formě kazety zůstává mezi první a druhou podložkou prostor pro vložení analytického vzorku, například tenké fólie nebo zvlhčeného povrchu.

Elektrody mohou být vyrobeny z materiálů, které obsahují uhlík, uhlíková vlákna, uhlíkové mikrotrubice a/nebo agregáty výše jmenovaných forem uhlíku.

Elektrody mohou být vyrobeny z uhlíkových fibril. Jedna nebo více jednotlivých fibril a/nebo jeden nebo několik agregátů fibril může být zpracováno tak, že vytvoří větší agregát (patent US 5,124,075).

Tento větší agregát tvoří matici nebo-li síto (dále označovaný jako „fibrilová matrice“), ve kterém mohou být

fibrily vzájemně zapleteny nebo protkány. Povrchová plocha fibrilových matic se zpravidla pohybuje od 50 do 400 m²/g.

Fibrilovou maticí lze použít jako maticovou elektrodu, protielektrodu nebo referenční elektrodu v analytické nebo preparativní elektrochemii. U jednoho provedení fibrilová matrice tvoří elektrodu pro elektrochemiluminescenci (ECL).

Vazebné domény PMAMS mohou být nesený fibrilovou maticí. PMAMS podle vynálezu má množinu diskrétních vazebných domén, z nichž dvě nebo více mohou být vzájemně identické nebo odlišné. Fibrilová matrice nese jednu nebo více vazebných domén.

Pro přípravu množiny vazebných domén na fibrilové matrice lze použít jeden nebo více mikroskopických vodičů tekutin. V množině mikroskopických vodičů tekutin mohou být přítomna různá nebo identická vazebná činidla a/nebo množina samostatných vazebných činidel.

Jak ukazují obrázky 22A a 22B, může se pro dopravu kapek, obsahujících požadovaná vazebná reakční činidla, výhodně souběžnou, do oblastí fibrilové matrice 2200 použít množina mikroskopických vodičů 2201 kapaliny, které umožní vytvoření diskrétních vazebných domén 2202. Tato vazebná reakční činidla vytvoří vazbu se zbytky, přítomnými na fibrilové maticí. Vazebná reakční činidla mohou být nespecificky adsorbována na maticí nebo sušena na povrchu.

Požadovaná vazebná reakční činidla jsou dopravována na fibrilovou maticí za současné vakuové filtrace, která se aplikuje na maticí. V tomto případě vakuová filtrace případně vtáhne část nebo všechna vazebná reakční činidla

do matrice nebo protáhne část nebo všechna vazebná činidla touto matricí a snižuje množství vazebných reakčních činidel, rozšiřujících se v průběhu vzorování na povrchu matrice do strany.

Fibrilové matrice lze připravit nalisováním suspenzí sazných fibril na podklad, kterým může procházet kapalina suspenze (například na filtr). Jako filtry, vhodné pro vytvoření fibrilových matric, lze použít například filtrační papír, filtry, vyrobené z polymerních (například neonových) membrán, kovová mikrosíta, keramické filtry, skleněné filtry, elastomerní filtry, filtry, tvořené skelnými vlákny a/nebo kombinace několika výše uvedených filtračních materiálů. Odborník v oblasti filtrace by měl vzít v úvahu, že tyto materiály jsou pouhými příklady celé řady možných materiálů, vhodných pro filtraci suspenzí pevných látek.

Obrázky 23A a 23B ukazují provedení, u kterého mohou být fibrilové matrice vyrobeny vakuovou filtrací. Disperze a/nebo suspenze uhlíkových fibril 2301 se filtruje za použití filtru 2300, případně opatřeného filtrační membránou 2303 a/nebo filtrační podložkou 2302. K filtraci suspenze se využívá odsávání, vytvořené vakuovým zdrojem 2305 přes filtrační baňku 2306. Fibrilová matrice 2304 se hromadí na filtrační membráně 2303 a/nebo filtrační podložce 2302. Fibrilová matrice 2304, případně s filtrační membránou 2303 může být sejmuta z filtru.

U dalšího provedení jsou suspenze fibril hnány skrz filtr za použití tlaku. U jednoho provedení se na vymezenou suspenzi fibril aplikuje tlak stlačením omezené vrstvy

vzduchu a/nebo kapaliny nad suspenzí pomocí pístu. U specifického provedení je suspenze fibril uzavřena uvnitř injekční stříkačky, pístem je injekční plunžr a jako filtr se použije jednorázově použitelný injekční filtr (v daném oboru je známa celá řada takových filtrů).

Suspenze fibril jsou tlačeny přes filtr kapilárním působením nebo filtrovány vztlínáním do filtru nebo přes filtr.

U dalšího provedení jsou jednotlivé fibrily nebo agregáty fibril kovalentně nasítovány do matric. Fibrily, které jsou modifikovány pomocí senzitivních zbytků, jakmile se exponují světlem, jsou ozařovány světlem.

Filtry lze použít pro zachycení fibril ve svých pórech a pro vytvoření kompozitní matrice, ve které filtr působí jako nosič. Jak ukazuje obrázek 24, fibrilová matrice 2400 může být připravena vedením suspenze fibril 2401, dodávané zdrojem 2402 mezi dva velké válce 2403. U tohoto způsobu, který lze považovat za analog způsobů používaných pro výrobu papíru nebo polymerních fólií, válce vytlačují kapalinu ze suspenze a tvoří se velká kontinuální matrice fibril, kterou lze rozřezat na menší matrice.

Fibrilové matrice mohou být samonosné nebo nesené.

Změnou rychlosti filtrace lze měnit požadované vlastnosti matrice. Jednou z vlastností, kterou lze tímto způsobem ovlivnit, je například rovnoměrnost nebo nerovnoměrnost struktury. Dalšími vlastnostmi jsou potom stupeň zapletení fibril nebo agregátů fibril, tloušťka matrice, poréznost matrice a/nebo kombinace těchto vlastností.

Suspenze uhlíkových fibril jsou určitým způsobem omezeny a kapalina, ve které jsou fibrily suspendovány, se pohybuje. U jednoho provedení se může kapalina, ve které jsou suspendovány fibrily odpařovat. U dalšího provedení se kapalina odstraňuje ohříváním, u ještě dalšího provedení se suspenze podrobuje odstředování a výsledná kapalina (například supernatant) se odstraní. U dalšího provedení se kapalina odstraňuje vakuací.

Suspenze může být umístěna na jeden nebo více filtrů, zvolených z výše popsaných filtrů, a může být vysušena odpařováním. Suspenze může být sušena ohříváním nebo pečením v peci, nebo lze kapalinu odstranit vymrazováním a extrahováním. U dalšího provedení se kapalina odstraňuje vakuováním pomocí čerpadla. Pro odstraňování kapalin ze suspenze existuje celá řada různých způsobů, které jsou dobře známy odborníkům v daném oboru.

Suspenze fibril, které budou vhodné pro vytvoření fibrilových matric filtrací, lze připravit dispergací jedné nebo více uhlíkových fibril ve vhodné kapalině, kvazi-pevné látce nebo gelu. Příkladem vhodných kapalin je například voda, ethanol, methanol, hexan, methylenchlorid, pufrované roztoky, povrchově aktivní činidla, organická rozpouštědla, roztoky, obsahující biologická média (například proteiny, protilátky nebo jejich fragmenty, buňky, subcelulární částice, viry, nukleové kyseliny, antigeny, lipoproteiny, liposacharidy, lipidy, glykoproteiny, cukry, peptidy, hormony nebo farmakologická činidla, roztoky kyselin nebo bází, oleje a/nebo jejich kombinace).

Suspenze podle vynálezu lze připravit dispergací uhlíkových fibril ve vodném roztoku pomocí sonifikace. U

dalšího provedení lze přidat povrchově aktivní činidlo a/nebo detergent.

Tloušťka fibrilové matrice se může pohybovat od 0,01 μm do 10 000 μm .

U výhodných provedení má fibrilová matrice tloušťku 1 μm až 100 μm . U zvláště výhodných provedení se šířka nebo průměr fibrilových matric pohybuje od 10 mm do 200 mm.

Fibrilovou maticí lze opakovaně promývat a refiltrovat, čímž se odstraní zbytkové materiály ze suspenze.

Fibrilové matrice, připravené filtrací nebo odpařováním, se ohřejí (například v peci) s cílem odstranit zbývající kapalinu ze suspenze, kterou se nepodařilo odstranit filtrací.

Pro vytvoření matric fibril, které se skládají z jedné nebo více distinktních vrstev, které jsou buď ve vzájemném kontaktu nebo se nacházejí ve své těsné blízkosti, lze použít postupnou filtraci. Vrstvy se mohou lišit několika vlastnostmi, zahrnujícími neomezujícím způsobem rozdílnou poréznost, hustotu, tloušťku, distribuci velikostí jednotlivých fibril a/nebo mikroskopických agregátů fibril, typem, počtem a/nebo velikostí fibrilových agregátů, chemickou modifikací fibril (viz níže) a/nebo přítomností další látky, navázané na fibrily.

Obr. 25 ukazuje vícevrstvou fibrilovou maticí 2500, připravenou postupnými filtračními kroky. První vrstvu tvoří 0,5 μm až 100 μm silná vrstva 2501 nemodifikovaných fibril; druhou vrstvu tvoří 0,5 až 10 μm silná vrstva

fibril 2502, v níž jsou zabudovány zbytky, například poly(ethylen glykoly), které jsou odolné proti adsorpci proteinů a dalších molekul; a třetí vrstvu tvoří 0,5 až 5 μm silná vrstva 2503, ve které je zabudovaná jedna nebo více vazebných domén (viz výše). Vazebné domény obsahují jednu nebo více protilátek 2504, které se váží na analyt 2505. Tento komplex protilátka/analyt může vázat označenou protilátku 2506. Značením může být ECL značení. U dalších provedení, může být značením jedna nebo více značení spadajících do množiny, popsané na jiném místě této přihlášky vynálezu. Taková vícevrstvá matrice může být samonosná nebo nesená jednou z výše popsané množiny možných nosičů.

Lze vytvořit vícevrstvé matrice, jejichž některé, nebo případně všechny, vrstvy mohou být odlišné.

Filtr, použitý pro vytvoření fibrilové matrice, fibrily a/nebo fibrilovou matici lze potáhnout. Povlaky u určitých provedení jsou kovové. Tyto povlaky mohou být vzorovány tak, že určité části jsou potaženy a ostatní nikoliv. U jednoho provedení se povlak nanáší za použití elektrolytického způsobu nanášení. V dalším případě se povlak nanáší způsobem, který nevyužívá elektrického náboje.

Filtr se pokovoval a fibrila se modifikovala pomocí funkční skupiny, která tvoří vazbu s uvedeným kovem. Filtrem je kovové síto nebo kovová fólie.

Fibrilová matrice může být plochá nebo deformovaná, pravidelná nebo nepravidelná, zaoblená nebo oválná, obdélníková nebo může mít libovolný tvar, tuhá nebo ohebná, transparentní, průsvitná, částečně nebo zcela neprůhledná,

a může mít kompozitní vlastnosti nebo oblasti s různými individuálními nebo kompozitními vlastnostmi.

Matricí může být kotouč nebo kus fólie.

Množina fibrilových matric může být vyrobena výhodně současně a výhodně ve skupině. U jednoho provedení vytvoří skupina mikroskopických vodičů tekutin množinu fibrilových matric na výše popsané podložce. U dalšího provedení se použije pro přípravu skupiny fibrilových matric skupina filtrů nebo vzorovaný filtr (například s oblastmi s různou porézností).

Pro překrytí určitých částí filtru nebo podložky lze použít masku s množinou otvorů (např. síto) a množina diskrétních fibrilových matric se vyrobí současně buď filtrací a/nebo odpařováním.

Fibrilové matrice mohou mít hustotu od 0,1 do 3,0 g/cm². Matrice může mít různou hustotu. Na matrici lze například v různých časových okamžicích působit mechanickou silou nebo-li tlakem, čím se hustota zvýší nebo sníží.

Fibrilové matrice mohou mít v sobě provedeny póry. Tyto póry mohou probíhat matricí částečně a/nebo zcela, nebo mohou tvořit součást sítě pórů. Tyto póry mohou mít rozměry, pohybující se v rozmezí od 5 nm do 100 nm. U výhodného provedení má fibrilová matrice póry s rozměry, pohybujícími se od 20 nm do 50 nm. Poréznost matrice může, kromě dalších faktorů, záviset na hustotě matrice.

Poréznost matrice může být konstantní v celé matrici, nebo se může zvyšovat, případně snižovat jako funkce polohy v matrici. Fibrilová matrice může mít celou řadu různě

velikých pórů, distribuovaných neorganizovaným a tedy nahodilým způsobem.

Fibrilová matrice může obsahovat distinktní oblasti s různou porézností. Fibrilová matrice může mít například jednu nebo více vrstev, z nichž každá má jinou poréznost. Fibrilové matrice mohou mít sloupce s různou porézností, které procházejí uvedenou maticí.

Poréznost matrice se může měnit. použitím různých množství agregátů uhlíkových fibril, přičemž tyto agregáty mají různou velikost, různý tvar, různé složení nebo kombinaci těchto vlastností. U příslušného provedení se matrice připraví z jednotlivých fibril, CC fibril (popsáno výše) a BN fibril (popsáno výše), nebo jejich kombinací. Fibrilová matrice může mít například některé póry dost velké na to, aby jimi mohly procházet objekty, velikostí odpovídající biologickým buňkám; některé póry matrice jsou tak velké, že jimi mohou procházet biologická média, která svou velikostí odpovídají proteinům nebo protilátkám; a některé póry jsou tak velké, že jimi mohou procházet pouze malé (molekulová hmotnost < 1000) organické molekuly.

Poréznost matrice může být taková, že do ní a/nebo skrze ni může difundovat jedna nebo několik molekul, kapalin, pevných látek, emulzí, suspenzí, plynů, gelů a/nebo disperzí. Poréznost fibrilové matrice je taková, že může být do matrice, uvnitř matrice nebo skrze matici difundováno (aktivně nebo pasívně) nebo hnáno, pomocí určitého prostředku, biologické médium. Příkladem biologických médií jsou například krev jako taková, frakcionalizovaná krev, plasma, sérum, moč, roztoky proteinů, protilátky nebo jejich fragmenty, buňky,

subcelulární částice, viry, nukleové kyseliny, antigeny, lipoproteiny, liposacharidy, lipidy, glykoproteiny, cukry, peptidy, hormony nebo farmaceutická činidla. Fibrilová matrice může mít jednu nebo více vrstev s různou porézností, takže materiál může procházet skrze jednu nebo několik vrstev, ale nikoliv skrze další vrstvy.

Fibrilová matrice je nesena dalším materiálem. Tímto nosným materiálem může být kov, umělá hmota, polymer, elastomer, gel, papír, keramika, sklo, kapalina, vosk, olej, parafín, organická pevná látka, uhlík, nebo směs dvou nebo více materiálů. Pokud je podložkou pevná látka, potom může obsahovat otvor nebo pór nebo množinu otvorů nebo pórů. U specifického provedení může být podložkou kovové síto, nylonová filtrační membrána nebo filtrační papír. Podložkou může být vodič, polovodič a/nebo izolant.

U provedení, popsaného v patentu US 5,304,326 a US 5,098,711, mohou být fibrily dispergovány v dalším materiálu. Fibrily mohou být dispergovány například v olejích, voscích, parafinu, umělých hmotách (například ABS, polystyrenu, polyethyleny, akrylonitrilu atd.), keramických materiálech, teflonu, polymerech, elastomerech gelu a/nebo v jejich kombinacích. Disperze fibril v dalších materiálech jsou vodivé. Disperze fibril v dalších materiálech mohou být tvářeny, lisovány, tvářeny ve formě, odlévány, odstředovány, protkávány, a/nebo spřádány tak, že vytvoří objekty požadovaného tvaru a/nebo formy. Tato fibrilová matrice může mít v sobě zabudován další materiál, například tenká vlákna, úlomky, kuličky kovu, který bude zvyšovat vodivost matrice. U dalšího provedení může mít v sobě fibrilová matrice zabudována další uhlíková, skleněná

a/nebo kovová vlákna s různou velikostí, tvarem a hustotou, čímž se vytvoří poréznost, odlišná od poréznosti dosažené pomocí samotných fibril. U dalšího provedení může mít v sobě fibrilová matrice zabudovány magnetické kuličky (například kuličky DYNAL). U posledního jmenovaného provedení mohou kuličky sloužit buď ke změně vlastností matrice nebo mohou být samotné použity jako podložka pod imobilizované vazebné domény.

Namísto uhlíkových fibril lze použít další uhlíková vlákna (například uhlíkové mikrostruktury, uhlíkové mikrotrubičky, vlákna typu „buckminsterfullerenes“, „buckytubes“, „fullerenes“ nebo jejich kombinace).

Uhlíkové fibrily mohou být modifikovány pomocí chemických funkčních skupin, kovalentně navázaných na jejich povrch. Jak popisuje mezinárodní přihláška WO 90/14221, tyto chemické funkční skupiny zahrnují neomezujícím způsobem karboxylovou skupinu, hydroxylovou skupinu, aminoskupinu, N-hydroxysukcinimid (NHS)-esterů, poly(ethylenglykoly), thioly, alkyl, $((CH_2)_n)$ skupiny a/nebo jejich kombinace. Tyto a další chemické funkční skupiny lze použít pro navázání dalších materiálů na povrch fibril.

Určité chemické funkční skupiny (například karboxylová skupina, aminoskupina, thioly a NHS-estery) lze použít k navázání dalších malých molekul na fibrily. Existuje celá řada možných kombinací těchto chemických funkčních skupin a malých molekul.

U celé řady provedení se NHS-esterové skupiny používají k navázání dalších molekul nebo materiálů, nesoucích nukleofilní chemickou funkční skupinu (například amin). U výhodného provedení se nukleofilní chemická

funkční skupina nachází na a/nebo v biomolekule, která je buď přirozená a/nebo chemicky modifikovaná. Mezi vhodné biomolekuly lze zahrnout neomezuujícím způsobem aminokyseliny, proteiny a jejich funkční fragmenty, protilátky, vazebné fragmenty protilátek, enzymy, nukleové kyseliny, a jejich kombinace. Toto je jeden z mnoha možných způsobů, a je obecně aplikovatelný na zde uvedené příklady a celou řadu dalších analogických materiálů a/nebo biomolekul. U výhodného provedení mohou být reakční činidla, která lze použít pro ECL, navázána na fibrilu přes NHS-esterové skupiny.

Protilátky, které lze použít v ECL testu, lze navázat na jednu nebo více fibril nebo fibrilovou matici pomocí kovalentních vazeb (například reakcí s NHS-estery), reakcí s vhodnými vazebnými činidly (viz výše), pomocí nespecifických vazeb a/nebo pomocí kombinace těchto metod. Nukleové kyseliny a/nebo buňky lze navázat na fibrily nebo fibrilové matrice pomocí kovalentních vazeb s NHS-estery, navázanými na fibrily.

Může být žádoucí řídit stupeň nespecifického navázání materiálů na fibrily a/nebo fibrilové matrice. Například může být žádoucí redukovat nespecifickou adsorpci proteinů, protilátek, fragmentů protilátek, buněk, subcelulárních částic, virů, séra a/nebo jedné nebo několika jeho složek ECL značení (například $\text{Ru}^{\text{II}}(\text{bpy})_3$ a $\text{Ru}^{\text{III}}(\text{bpy})_3$ derivátů), oxalátů, trialkylaminů, antigenů, analytů a/nebo jejich kombinací, nebo nespecifickou adsorpci proteinů zcela eliminovat. U dalšího provedení může být žádoucí zvýšit stupeň navázání biomolekul.

Jeden nebo více chemických zbytků, které redukuje nebo eliminuje nespecifickou vaznost, se mohou nacházet v jedné nebo více fibrilách, v jednom nebo více fibrilových agregátech a/nebo fibrilové matici, na jedné nebo více fibrilách, jednom nebo více fibrilových agregátech a/nebo fibrilové matici, nebo v jejich blízkosti. Nespecifická vaznost je regulována kovalentním navázáním PEG zbytků na jednu nebo více fibril a/nebo fibrilovou matici. Na jednu nebo více fibril a/nebo fibrilovou matici lze kovalentně navázat zbytky s nábojem (například fosfáty, amonné ionty).

Materiály, použité v podložce, elektrodě a/nebo vazné doměně, lze ošetřit povrchově aktivními činidly, čímž se sníží nespecifická vaznost. Fibrily nebo fibrilové matrice mohou být například ošetřeny povrchově aktivními činidly a/nebo detergenty, které jsou dobře známy odborníkům v daném oboru (například řadou Tween, Triton, Span, Brij). Fibrily, nebo fibrilové matrice se promývají roztoky povrchově aktivních činidel a/nebo detergentů, inkubují se těmito roztoky, sonifikují se těmito roztoky, namáčejí se do těchto roztoků a podrobují se kombinaci uvedených metod. Roztoky PEG a/nebo molekul, které mají podobné chování jako PEG (například oligosacharidy nebo polysacharidy a další hydrofilní oligomery nebo polymery) („Polyethylene glycol chemistry: Biotechnical and biomedical applications, Harris, J.M. Editor, 1992, Plenum Press), mohou být použity namísto povrchově aktivních činidel nebo detergentů a/nebo společně s těmito činidly a/nebo detergenty.

Nežádoucí nespecifickou adsorpci určitých entit, například výše jmenovaných entit, lze blokovat konkurenční nespecifickou adsorpcí. Těmito konkurenčními vaznými

druhy by mohl být imunoglobulin G (IgG) albuminu bovinního séra (BSA).

Nespecifickou vazebnost ECL-TAG lze redukovat chemickou modifikací TAG. TAG lze modifikovat například způsobem, který zvýší jeho hydrofilní charakter (například přidáním hydrofilních polárních vodíkových vazeb a/nebo funkčních skupin s nábojem na bipyridylové ligandy v $\text{Ru}(\text{bpy}_3)$), a tedy sníží jeho nespecifickou vaznost TAG k dalším povrchům.

Může být žádoucí imobilizovat biomolekuly nebo další média na fibrilách nebo fibrilových maticích. Jedním způsobem může být navázání protilátek, fragmentů protilátek, proteinů, enzymů, enzymových substrátů, inhibitorů, kofaktorů, antigenů, haptenu, lipoproteinů, liposacharidů, buněk, subcelulárních složek, buněčných receptorů, virů, nukleových kyselin, lipidů, glykoproteinů, uhlohydrátů, peptidů, aminokyselin, hormonů, ligandů vázících protein, farmakologických činidel a/nebo jejich kombinací.

Rovněž může být žádoucí navázání nebiologických entit, například polymerů, elastomerů, gelů, povlaků, ECL značení, redoxních účinných druhů (například tripropylaminu, oxalátů), anorganických materiálů, chelatačních činidel, a vazebných činidel na fibrily.

Jeden nebo více druhů, nebo množina druhů, může být navázáno na povrch fibril nebo fibrilovou matici nespecifickým způsobem (například adsorbováno).

Biologické molekuly nebo další média lze navázat na fibrily nebo fibrilové matrice nespecifickou adsorpcí.

Stupeň nespecifické adsorpce pro danou fibrilu, fibrilovou matici a/nebo biomolekulu se stanoví na základě jejich konkrétních vlastností. Určité chemické funkční skupiny nebo biologické zbytky, které se nacházejí na fibrilách, mohou snižovat nebo naopak zvyšovat nespecifickou vaznost. Přítomnost hydrofobních a/nebo hydrofilních oblastí na povrchu proteinu může zvyšovat nebo snižovat nespecifickou vazbu proteinu na fibrily nebo fibrilové matrice. Hydrofilní a/nebo hydrofobní oblasti se použijí pro řízení nespecifické vaznosti v kontrolovaných oblastech.

Fibrily je možné modifikovat pomocí alkyl(CH_2) řetězců a/nebo skupin karboxylových kyselin, a tím zvýšit nespecifickou vaznost biologických molekul nebo médií, nebo dalších materiálů.

Obrázek 26 schematicky znázorňuje výše popsané provedení na případu jediné fibrily. Fibrila 2600 je modifikována alkylovými řetězci 2601. Biomolekuly 2602, 2603 a 2604 se nespecificky váží na alkylové řetězce. Rovněž je navázán polymer/elastomer 2605.

Nemodifikované fibrily, fibrilové agregáty a/nebo fibrilové matrice se použijí pro imobilizaci biomolekul biologického média a dalších materiálů pomocí nespecifické vazby.

ECL TAG obsahuje zbytky s nábojem. ECL TAG se připraví tak, aby byl selektivně přitahován k podložce a/nebo elektrodě. Modifikovaný ECL TAG má zbytkový negativní náboj a může mít například relativně nízkou afinitu k elektrodě při vyšším redukčním potencionálu, a má vyšší afinitu k elektrodě, jejíž elektrodový potenciál bude spíše oxidační. Afinita ECL TAG a/nebo vazebných reakčních činidel k

elektrodě se může měnit (například snižovat v průběhu navázání a/nebo promývání a zvyšovat spolu s rostoucím účinným potenciálem, kterému je tak ECL vystaven v průběhu odečítání ECL).

Jak ukazuje obrázek 28, mohou být molekuly (jak biologické, tak nebiologické) navázány na fibrily pomocí kovalentní vazby. Fibrily 2800, nesoucí NHS-esterové chemické funkční skupiny, mohou tvořit kovalentní vazby 2801 s biomolekulami nebo biologickým médiem 2802, 2803. Tato biologická média mohou použít aminoskupinu k uvedení do reakce s NHS-esterovou skupinou, pro vytvoření kovalentní vazby. Polymer 2808 je imobilizován. Odborník v daném oboru by měl vzít v úvahu, že NHS-esterové skupiny jako vazebná činidla pro molekuly byla zvolena jako obecný příklad a měl by být schopen zvolit jak vhodné biomolekuly, tak vhodné reakční podmínky pro dosažení imobilizace.

Pár zbytků a/nebo molekul „M1“ a „S1“, z nichž jedna nebo více, je navázáno na fibrilu, vykazuje společnou afinitu nebo vazebnou kapacitu. M1/S1 mohou představovat protilátku/antigen, protilátku/hapten, enzym/substrát, enzym/kofaktor, enzym/inhibitor, lektin/uhlohydrát, receptor/hormon, receptor/efektor, nukleovou kyselinu/nukleovou kyselinu, protein/nukleovou kyselinu, vir/ligand, buňku/buněčný receptor atd.. Je známa celá řada kombinací „vazebných párů“ M1/S1 a po dosažení požadované vaznosti je možné zvolit vhodné kombinace. M1 a/nebo S1 mohou být navázány na jedné fibrile nebo na více fibrilách.

Obrázky 27 a 28 znázorňují některé možné konfigurace. Jak ukazuje obrázek 27, fibrila 2700, modifikovaná alkylovými řetězci 2701, nespecificky vážícími molekulu

2702, která má vzájemnou afinitu, nebo-li vazebnou kapacitu, pro další molekulu 2703. Molekula 2703 je dále navázána na další molekulu 2704. Na fibrilu může být nespecificky adsorbována blokační molekula 2705. Blokační polymer 2706 a/nebo polymer 2707, který má ligand 2708 s afinitou pro molekulu 2709, jsou adsorbovány nespecifickým způsobem.

Obrázek 28 znázorňuje fibrilu 2800, kovalentně navázanou přes vazbu 2801 k biomolekulám 2802, 2803 a k molekule 2804. Molekula 2804 vazebného činidla má vzájemnou afinitu, nebo-li vazebnou kapacitu, pro další biomolekulu 2805. Biomolekula 2803 má vzájemnou afinitu, nebo-li vazebnou kapacitu, pro další vazebnou molekulu 2806, která je kovalentně navázána na molekulu 2807. Polymer 2808 s ligandem 2812, který je specifický pro vazebného partnera 2809, je kovalentně navázán na fibrilu. Blokační molekuly (například BSA) 2811 a blokační polymery 2810 jsou kovalentně navázány.

Fibrila může být modifikována biotinem a/nebo biotinem, derivovaným vazebným činidlem, a avidin a/nebo streptavidin může vázat toto vazebné činidlo. Avidin a/nebo streptavidin může být navázán na fibrilu a/nebo může vázat biotinem substituovanou protilátku a/nebo protein. Avidin a/nebo streptavidin může být imobilizován na fibrilách nespecifickým navázáním, kovalentní vazbou pomocí dalšího nebo stejného vazebného páru, nebo kombinací těchto technik. Použití streptavidinu a biotinu jako „vazebných párů“ je běžně používanou metodou pro navázání molekul nebo biologického média na další materiály a je dobře známo odborníkům v daném oboru (Spinke a kol., 1993, Langmuir 9:1821).

Vazebným párem může být monoklonová protilátka a antigen, který váže tuto protilátku.

Lze vytvořit množinu vazebných párů (například M1/S1/M2). M1 znamená monoklonální protilátku, S1 znamená antigen k M1 a M2 znamená protilátku, která se váže na S1. Tento komplex může tvořit „sendvičový“ komplex protilátka/antigen/protilátka (tyto protilátky mohou, ale nemusí být monoklonové). M2 může být protilátkou, zakončenou ECL aktivním značením (viz výše), fluorescenčním značením, radioaktivním značením, enzymovým koncem a/nebo jejich kombinacemi.

M1 může znamenat zbytek, který je schopen tvořit komplex s kovem, kovovým iontem nebo organokovovou sloučeninou („chelatačním činidlem“) a S1 znamená kov, kovový iont nebo organokovovou sloučeninu („chelát“), která tvoří komplex s M1 a M2 znamená zbytek na biologické molekule, který se váže na komplex M1/S1 (Gershon a Khilko, 1995, Journal of Immunological Methods, 7371).

Výroba vzorů kovových elektrod a vodivých prvků pro distribuci elektrického proudu do těchto elektrod na povrchu se provádí různými, v daném oboru známými, způsoby (viz například Leventis a kol., patent US 5,189,549).

~~Nanášení kovových fólií na transparentní povrchy, které se~~
používá pro výrobu displejů na bázi tekutých krystalů, je snadno aplikovatelné při výrobě elektrod podle vynálezu (Haneko, 1987, Liquid Crystal TV Displays, Principles and Applications of Liquid Crystal Displays, KTK Scientific Publishers, Tokyo, D. Reidel Publishing). Rovněž lze připravit transparentní elektrodové povrchy, například způsobem, který popsal DiMilla a kol., 1994, J. Am. Chem.

Soc. 116(5):2225 až 2226. Na transparentní povrchy (skleněné nebo plastické) se nanese 0,5 nm titanu a 5 nm zlata. Tenká vrstva zlata, která se připraví způsobem, který, jak již bylo uvedeno výše, popsal DiMilla, může být použita pro přípravu transparentní elektrické struktury výše popsaným způsobem podle Kumara. Odborníkům v daném oboru jsou známy modifikace tohoto postupu, které vedou ke zvýšení tloušťky vodivých vrstev, které je spojeno se zvýšením kapacity vodivosti proudu, za současného výhodného zachování transparentnosti. Tyto techniky lze použít pro přípravu elektrodových povrchů na diskrétních vazebných doménách PMAMS nebo v jejich blízkosti.

Fólie a/nebo monovrstvy mohou být dále tvořeny spíše než izolačními zbytky (například alkylovými řetězci) zbytky, které usnadňují přenos elektrického potenciálu z elektrodového povrchu k ECL značení, jak uvádí Zhang a Bard. Pro elektronový přesun lze například použít pí orbitálový překryv v extenzívně konjugovaných systémech. Tento pí orbitálový elektronový přesun poskytuje polypyrrol nebo další struktury s konjugovanými kruhy nebo dvojnými vazbami.

Oligonukleotidy lze použít pro modulaci elektronového přenosu. Překrývající se pí vazby v dvojitém řetězci DNA lze například použít pro zvýšení rychlosti přenosu elektronů. Oligonukleotidy, navázané na elektrodový povrch, lze použít jako vazebné činidlo ve vazebné doméně. Po navázání komplementární oligonukleotidové sekvence se vytvoří dvojitý řetězec s organizovanými, vzájemně se překrývajícími pí vazbami. U určitého provedení je první imobilizovaný oligonukleotid (například kovalentně navázaný na podložku) označen pomocí ECL značení. U dalšího

provedení je ECL značením označen sekundární komplementární oligonukleotid nebo oligonukleotid s částečně komplementární sekvencí k primárnímu oligonukleotidu. Terciální komplementární oligonukleotid nebo oligonukleotid s částečně komplementární sekvencí k sekundárnímu oligonukleotidu je označen například v případě sendvičového testu. Lze použít větvené oligonukleotidové řetězce. Může být použita celá řada oligonukleotidů a/nebo oligonukleotidů, podobných molekule (například oligonukleotidy s modifikovanými bázemi a/nebo modifikovanými hlavními řetězci, obsahujícími například síru a/nebo dusík). Mohou být provedeny různé studie. Proměnná stabilita pí překryvů u oligonukleotidů a/nebo oligonukleotidových komplexů může být monitorována jako modulace elektronového přenosu. Signál (například generované ECL světlo a/nebo naměřené impedance), generovaný z pí vazbou stabilizovaného pomocí ECL označeného dvojitého řetězce oligonukleotidového páru, může být korelován proti signálu a/nebo očekávanému signálu s menší měrou uspořádaného řetězcového oligonukleotidu. Rozdíl v ECL signálu mezi zcela komplementárním označením dvouřetězcovým oligonukleotidem a částečně komplementárním označením dvouřetězcovým oligonukleotidem lze korelovat. Dále lze použít oligonukleotidové komplexy množiny oligonukleotidů. Například lze použít trojšroubovice.

Modulaci rychlostí přenosu elektronů lze měřit pomocí ECL detekce, a stejně tak pomocí elektronových prostředků. ECL značení mohou být kovalentně navázána na oligonukleotidové řetězce a/nebo nekovalentně připojena, například vmezeřena. DNA může být navázána na elektrodu bez použití vazebného činidla (například adsorpcí DNA s thiolem

na 5'-konci na zlato) nebo pomocí krátkého (méně než 10 atomů) vazebného činidla, které zajistí nízkou rezistenci. Pokud jde o přenos elektronů z DNA na elektrodu, lze použít vazebný řetězec, který může účinně transportovat elektrony z elektrody na DNA řetězec (například polyacetylenový řetězec).

Lze použít směsovou monovrstvu a/nebo fólii, ve které bude alespoň jedna složka monovrstvy nebo fólie usnadňovat přenos elektrického potenciálu. Alternativně se může na monovrstvu nebo fólii adsorbovat molekula nebo částice, která usnadní přenos elektrického potenciálu, takže lze použít například i konjugované monovrstvy a/nebo vodivé mikročástice, které jsou adsorbovány na elektrodovém povrchu a/nebo v jeho blízkosti. V monovrstvě a/nebo fólii jsou vytvořeny podle určitého vzoru pravidelné mezery. Použití řízeně vytvořených vzorů mezer v uspořádaných, v podstatě kolmých SAM, tvořených alkanthioly s dlouhými řetězci (tj. izolanty), ke kterým se následně naváží ECL značení, lze regulovat účinný potenciál, odebraný ECL značeními. Obrázek 11 například ukazuje kazetu 1200, tvořenou jedinou podložkou 1202, kovovou vrstvou 1204, vzorovanými SAM 1206 a mezerami 1208 mezi SAM vzory.

Proteiny, značené ECL, mohou být nekovalentně navázány na povrch monovrstvy. Protein, značený pomocí ECL, může být adsorbován na zlatém povrchu, modifikovaném methylem zakončeným alkanthiolem. Zlatý povrch může působit jako pracovní elektroda nebo protielektroda. Množina vazebných domén může být inkorporována na jediné podložce, jak ukazují obrázky 11 až 13. U výhodných provedení vazebné domény obsahují značené a/nebo neznačené proteiny a/nebo nukleové kyseliny a/nebo buňky a/nebo chemické druhy.

Alternativně mohou mít jednotlivé složky monovrstvy různé délky (například délky alkanového řetězce v alkanthiolových monovrstvách), čímž se dosáhne regulace účinného potenciálu na odkrytém povrchu monovrstvy.

Alkanthioly mohou mít obecně délku uhlíkových řetězců 1 až 100 uhlíků. U výhodného provedení se délka uhlíkového řetězce alkanthiolu pohybuje od 2 do 24 uhlíků. U výhodnějšího provedení se tato délka pohybuje v rozmezí od 2 do 18 uhlíků a u nejvýhodnějšího provedení se délka uhlíkového řetězce pohybuje v rozmezí od 7 do 11 uhlíků. Tyto alkanthioly mohou mít různé koncové skupiny vystavené testovanému médiu, přičemž tyto skupiny zahrnují methylové skupiny, hydroxyskupiny, aminy, karboxylové kyseliny oligo(ethylenglykoly), fosfátové skupiny, fosforylové skupiny, biotin, kyselinu nitrilotrioctovou, glutathion, epoxidy, dinitrofenyl a/nebo NHS estery. Mezi další koncové skupiny lze zařadit ligandy, běžně používané pro čištění a imobilizaci rekombinantních fúzních proteinů (například Sassenfeld, 1990, TIBTECH 8:88 až 93). Vazebné domény mohou být do určitého stupně modifikovány. Touto modifikací se dosáhne různých hustot reakčních činidel. Například lze použít různé hustoty aktivovatelných chemií a/nebo lze modifikaci provádět do různých stupňů. Pro vytvoření požadovaných vazebných hustot lze použít smísených chemií.

Smísené monovrstvy lze použít pro regulaci hustoty aktivovatelných skupin a/nebo vazebných reakčních činidel. Regulací hustoty vazebných skupin se optimalizuje poměr ECL signálů a šumu. Celkový počet vazebných míst uvnitř vazebné domény (domén) se reguluje za účelem optimalizace intenzity ECL světelného signálu s ohledem na další ECL vazebné signály z další vazebné domény (domén), pokud jsou tyto ECL

vazebné signály detekovány sekvenčně nebo současně a/nebo s ohledem na světelný detekční prostředek.

Napětovou vlnu lze aplikovat tak, aby jednou nebo několikrát aktivovala ECL značení příslušející k vazebné doméně (doménám) v PMAMS. Na tentýž povrch modifikovaný alkanthiolem s navázaným ECL značením lze elektronický potenciál, dostatečný pro aktivaci ECL světla, aplikovat opakovaně a generovat tak množinu ECL světelných signálů. Aplikovaný elektronický potenciál je takový, že reverzibilně generuje ECL. Alternativně se aplikuje potenciál, který generuje ECL kvazireverzibilně. U kvazireverzibilní řady napětových vln může být vazebná doména, ke které je připojeno ECL značení (například navázáno), chemicky a/nebo fyzikálně změněna. Aplikovaná řada napětových vln může vyvolat nevratné generování ECL světla.

Dále lze aplikovat elektrický potenciál, dostatečný pro uvolnění složek monovrstvy. Uvolnění těchto složek monovrstvy je žádoucí v místech, kde je objem nad povrchem elektrody malý (například další podložka nebo deska, spočívající na povrchu elektrody). V tomto případě, jakmile dojde k porušení monovrstvy, mohou být povrchem elektrody excitována i určitá ECL značení, která nejsou dostatečně excitována, čímž dojde ke generování elektrochemiluminescenčního signálu a ECL značení jsou omezena na malý objem, omezující difúzi elektrody. Pro řízení stupně porušení monovrstvy pro daný potenciál lze použít různá složení monovrstvy. Monovrstva se složkami se silnou mezisložkovou afinitou bude odolnější, pokud jde o porušení monovrstvy. Rezistence proti porušení monovrstvy je u thiolů s delšími alkanovými řetězci vyšší, než u thiolů s

kratšími alkanovými řetězci. Změnou délky řetězce lze dosáhnout požadované stability.

Pro modulaci ECL signálu lze použít modifikaci vazebných domén v PMAMS. Řada napětových vln se aplikuje tak, aby generoval množinu ECL signálu. Tuto množinu ECL signálu lze použít pro získání mimořádných a/nebo lepších výsledků. Statistická analýza četnosti modulace ECL signálu může být korelována celkové kvalitě jedné nebo několika vazebných domén. Množinu ECL signálu lze dále použít pro zesílení signálu oproti šumu, například filtraci určitých ECL signálů této řady. Navíc lze pro snížení nežádoucí modulace signálu, způsobené nespecifickými vazbami, použít násobné vlnové pulzy elektronického potenciálu. Aplikací elektronického potenciálu lze zabránit nespecifickému navázání určitých chemických druhů, opatřených nábojem. Kromě toho lze elektronický potenciál aplikovat tak, aby podpořil lokalizaci určitých analytů nebo sledovaných chemických druhů v blízkosti vazebných domén. Aplikovaná napětová vlna dodá nadbytečný potenciál (například potenciál vyšší, než je potřeba pro generaci ECL). Nadbytečné potenciály lze použít pro modulaci ECL signálů v řadě napětových vln nebo v jediném pulzu napětové vlny. Dále lze nadbytečné potenciály použít pro modulaci ECL reakční kinetiky a/nebo modulaci vazebného potenciálu chemickým a/nebo fyzikálním způsobem. Déle jedna nebo několik napětových vln a/nebo další elektronické sondy, známé odborníkům v daném oboru, mohou být použity pro stanovení a/nebo korelování a/nebo extrapolování informace na kvalitu a/nebo elektronické vlastnosti elektrody.

Účinnost ECL reakce lze výhodně zvýšit rozšířením povrchové plochy pracovní elektrody uvedením dalšího

vodivého prostředku do kontaktu s elektrodami. Výčnělky nebo výběžky, vybíhající z elektrody, například dráty nebo hrotové elektrody, vyrobené z vodivých materiálů nebo vodivé částice, lze použít pro zvýšení povrchové plochy elektrody a pro přiblížení elektrického pole ECL značení. Stejnému účelu mohou sloužit důlky nebo jamky.

U jednoho provedení mohou vodivé částice vyplňovat mezery na povrchu elektrody a/nebo pokrývat podložku nebo monovrstvu, takže zvýší maximální měrou elektrické pole okolo ECL značení (viz obrázek 12). Tyto vodivé částice rozšiřují povrchovou plochu elektrody a tím zvyšují účinnost ECL reakce. Obrázek 12 ukazuje kazetu 1300, která má podložku 1302, nesoucí na kovové vrstvě 1304 strukturovaný SAM 1306 a naznačuje vodivé mikročástice, vyplňující mezery (například 1208 na obrázku 11) a vybíhající nad kovový povrch mezi vzory SAM. V případě magneticky vodivých částic lze použít magnet nebo magnetické pole k přitažení těchto částic k povrchu. Vodivé částice lze rovněž použít, jak již bylo popsáno, pro rozšíření elektrického potenciálu mezi povrchy elektrody a vazebnou doménou PMAMS s dvěma přiblíženými podložkami. Obrázek 8 znázorňuje kazetu 900, tvořenou první podložkou 902, opatřenou množinou uspořádaných elektrod a druhou podložkou 904, opatřenou PMAMS. Vodivé mikročástice 906, které se nacházejí mezi přilehlými povrchy rozšiřují elektrický potenciál směrem k ECL značení na vazebných doménách (není znázorněno).

Alternativně mohou z otevřených mezer na elektrodovém povrchu vyrůstat vodivé polymery, které usnadní rozšíření elektrického potenciálu okolo ECL značení vzorku, jak ukazuje obrázek 13. Obrázek 13 znázorňuje kazetu 1400,

která obsahuje podložku 1402 nesoucí na vzorovaném SAM povrchu 1406 kovovou vrstvu 1404. Vodivé polymery 1408 přerůstají přes SAM povrch a rozšiřují elektrické pole, vytvořené množinou uspořádaných elektrod (není znázorněno) k vazebným doménám (nejsou znázorněny) na SAM povrchu. Pro rozšíření elektrického potenciálu mezi elektrodovými povrchy a vazebnými doménami PMAMS dvou přiblížených položek lze rovněž použít vodivé polymery (viz obrázek 7). Obrázek 7 znázorňuje kazetu 800, tvořenou přiblíženými podložkami 802 a 804. Vodivé polymery 806 rostou mezi přilehlými povrchy, takže rozšiřují elektrický potenciál směrem k ECL značení na vazebné doméně (není znázorněna).

Obrázek 9 znázorňuje kazetu 1000, tvořenou první podložkou 1002 opatřenou multielektrodovým seskupením a druhou podložkou 1004 mající PMAMS vazebný povrch, přičemž vodivé výběžky 1006 (například jemné dráty) pracovní elektrody rozšiřují elektrické pole okolo ECL značení v PMAMS vazebných doménách.

Elektrodové páry mohou mít celou řadu konfigurací. Nejjednodušší konfigurace, znázorněné na doprovodných obrázcích, jsou vyrobeny z kovových fólií a/nebo fólií kovových oxidů a/nebo polovodičových fólií aplikovaných na nevodivý rovný povrch. Elektrody těchto elektrodových párů mezi sebou výhodně definují oblast s relativně konstantní šířkou a poskytují tak relativně konstantní elektrické pole.

Je možné použít i další konfigurace elektrod. Několik těchto konfigurací ukazují rovinné pohledy na obrázcích 19(a) až 19(e). Obrázek 19(a) ukazuje vzájemně do sebe zapadající hřebenový elektrodový pár. U této struktury má

každá elektroda množinu zubů vybíhající z vodiče a vytvářející hřebenový tvar. Pár elektrody a protielektrody se může nacházet vedle vazebné domény nebo může tuto vazebnou doménu obklopovat. Obrázek 19(b) ukazuje pár soustředných elektrod, z nichž jedna je kruhová a druhá půlkruhová. Obrázek 19(c) znázorňuje dvě půlkruhové elektrody, které jsou k sobě přivráceny rovnými hranami. Obrázek 19(d) ukazuje pár obdélníkových elektrod. Obrázek 19(e) ukazuje pár do sebe vzájemně zasahujících elektrod, které mají komplementárně přivrácené zakřivené povrchy, které mezi sebou vymezují mezeru ve tvaru sinusoidy.

Elektrodovým a protielektrodovým párům lze rovněž udělit specifický tvar, který bude komplementárně přizpůsoben tvaru PMAMS vazebného povrchu. Příkladné tvary jsou znázorněny na obrázku 6B. Tento obrázek znázorňuje podložku 712, nesoucí elektrodové páry 714 až 720. Elektrodové páry mohou být například kruhové 714, vzájemně do sebe zapadající 716, trojúhelníkové vzájemně do sebe zapadající 718 nebo multielektrodové vzájemně do sebe zapadající 720.

U provedení znázorněných na obrázku 14 až 19, diskutovaných výše, jsou elektrody umístěny k jediné podložce. Alternativně jsou elektrodové páry umístěny na první a druhé protilehlé podložce, jak znázorňuje obrázek 2.

Kazety

Kazety obsahují jednu nebo více podložek podle vynálezu. Kazety mohou zahrnovat množinu vazebných domén a jednu nebo několik pracovních elektrod.

Obrázek 2 znázorňuje kazetu, ve které každá z množiny vazebných domén 30 na podložce 26 sousedí s jinou elektrodou z množiny elektrod 32. Protielektrody 38 jsou provedeny na druhé podložce 28. Test se provádí již popsaným způsobem tak, že se na vazebné domény 30 umístí vzorek a následně se podložky 26 a 28 posunou tak, že se protielektrody 38 ocitnou vedle jednotlivých vazebných domén 30 a ECL reakce může být spuštěna pomocí vlnového generátoru 39 a vodiče 34 a ECL signál detekován a zaznamenán světelným detekčním prostředkem 40 a prostřednictvím drátu 41 převeden do digitálního počítačového prostředku 42.

Obrázek 3 znázorňuje kazetu, ve které každá z množiny vazebných domén 48 sousedí s jiným párem z množiny elektrodových a protielektrodových párů 50 na podložce 44. Podložka 46 může být případně umístěna vedle podložky 44 tak, že bude tvořit prostředek obsahující vzorek a sousedící s množinou vazebných domén 48 a množinou elektrod 50. ECL reakce může být tedy spuštěna přes elektrický spoj 52 vlnovým generátorem 54 a ECL signál může být detekován světelným detekčním prostředkem 56 a zaznamenán a analyzován digitálním počítačovým prostředkem 58.

Předmětem vynálezu je rovněž kazeta, která obsahuje jeden nebo několik párů podložek, jak znázorňuje obrázek 21, přičemž každý pár podložek je situován tak, že

povrch první podložky 1501, který obsahuje vazebné domény, je orientován směrem k povrchu obsahujícímu vazebné domény na druhé podložce 1502, přičemž součástí obou povrchů jsou elektrody 1504 a vazebné domény 1506, takže každá vazebná doména na první podložce je orientována směrem k elektrodě na druhé podložce a je s touto elektrodou zarovnána, a každá vazebná doména na druhém povrchu je orientována směrem k elektrodě na první podložce a je s touto elektrodou zarovnána.

Obrázek 4 znázorňuje kazetu, ve které jsou ECL elektrody volitelné. Vazebné domény 64 na podložce 60 se kontaktují se vzorkem, u něhož se očekává, že obsahuje analyt. Oblasti 66 na podložce 62 obsahují reakční médium pro detekování nebo měření sledovaného analytu nebo pro provádění požadované reakce. Podložka 60 a podložka 62 se zkompletují tak, že se vazebné domény 64 a oblasti 66 dostanou do kontaktu s analytem nebo s reakčním produktem, který se stanoví záznamovým systémem, například pomocí kolorimetrického chemiluminescenčního nebo fluorescenčního signálu, který je detekovatelný fotodetekčním prostředkem 68 a může být zaznamenán a analyzován pomocí digitálního počítačového prostředku 70.

U výhodného provedení obsahuje kazeta nebo zařízení podle vynálezu prostředek pro dodávku vzorku do množiny diskrétních vazebných domén (viz například prvek 1 na obrázku 1 patentu US 5,147,806; a prvek 1 na obrázku 1 patentu US 5,068,088). Prostředek pro dodávku vzorku může být stacionární nebo pohyblivý a může ho tvořit libovolný, v daném oboru známý, prostředek, zahrnující neomezuujícím způsobem jeden nebo více vstupů, otvorů, pórů, kanálků,

trubic, mikroskopických vodičů kapalin (kapilár), hadiček a kolíkových zátek. Kapaliny lze systémem dopravovat pomocí celé řady dobře známých metod, například pomocí čerpadel, pipet, injekčních stříkaček, gravitačního proudění, kapilárního účinku, vztlínání, elektroforézy, tlaku, podtlaku atd.. Prostředek pro dopravování kapaliny může být umístěn v kazetě nebo v samostatné jednotce. Vzorek může být umístěn na všechny vazebné domény najednou. Alternativně lze vzorek umístit na příslušné vazebné domény kapilárním kapalinovým transportním prostředkem. Vzorky lze rovněž umístit na podložku pomocí automatických pipet, určených pro dopravu kapalinových vzorků, přímo na PMAMS na podložce nebo do zásobníku v kazetě nebo kazetovém držáku, odkud jsou později dopravovány přímo na vazebný povrch.

Podložky mohou být vyrobeny z materiálu, zahrnujících neomezuujícím způsobem sklo, umělou hmotu, keramiku, polymerní materiály, elastomerní materiály, kovy, uhlík nebo materiály obsahující uhlík, slitiny, kompozitní fólie, silikon a vrstvené materiály. Podložky mohou mít široké spektrum strukturních chemických a/nebo optických vlastností. Mohou být tuhé nebo ohebné, ploché nebo deformované, průhledné, průsvitné, částečně nebo zcela reflexní nebo neprůhledné a mohou mít kompozitní vlastnosti, oblasti s různými vlastnostmi a mohou představovat kompozit více než jednoho materiálu.

Reakční činidla pro provádění testů mohou být uložena v kazetě a/nebo v samostatném zásobníku. Reakční činidla mohou být uložena v suchém a/nebo mokrému stavu. U jednoho provedení podle vynálezu se suchá reakční činidla v kazetě opět hydratují přidáním testovaného vzorku. U jiného

provedení jsou reakční činidla skladována v roztoku v „blistrových baleních“, která se otevřou v důsledku působení tlaku, vyvolaného pohyblivým válcem nebo pístem. Kazety mohou obsahovat oddělení pro odpad nebo houbu pro ukládání kapalného odpadu po ukončení testu. U jednoho provedení kazeta zahrnuje zařízení pro přípravu biologického vzorku, určeného pro test. Součástí kazety může být rovněž filtr pro izolování buněk z krve. V dalším případě může kazeta zahrnovat zařízení například pro odměření vzorku.

Množina vazebných domén a množina elektrod a protielektrod je na podložce zpravidla rozmístěna v určitém uspořádání, přičemž pro nastavení vzdálenosti mezi jednotlivými doménami, elektrodami a protielektrodami lze použít různé mechanické prostředky, například vodící tyče, stavěcí kolíky, závěsy (mezi jednotlivými podložkami) nebo vodící hrany. Pro umístění obou podložek lze použít optické vodící prostředky a elektronické prostředky, používající optické vodící značky definované na podložkách. Rovněž přijatelné jsou systémy, které používají elektrické nebo magnetické nastavení.

Podložky kazety mohou být uspořádány tak, aby chránily elektrodové páry před kontaktem se vzorkem až do okamžiku, kdy bude žádoucí spustit ECL reakci. Elektrody lze udržovat odděleně a separovat od povrchu s vazebnými doménami do okamžiku, kdy bude žádoucí elektrický kontakt se vzorkem, použitím různých mechanických prostředků, například odstranitelných elektrodových ochranných prostředků.

Kazeta nebo zařízení podle vynálezu obsahuje referenční elektrody, například Ag/AgCl nebo nasycenou kalomelovou elektrodu (SCE).

Podložky mohou být drženy pohromadě pomocí svorek, adheziva, nýtů, kolíků nebo kteréhokoliv dalšího vhodného mechanického uchycení. Mohou být drženy pohromadě rovněž pomocí povrchového napětí kapalného vzorku nebo pomocí kompresních prostředků, odstranitelně umístěných na odvrácených stranách těchto dvou podložek.

Kazety mohou rovněž obsahovat více než dvě podložky, například se střídajícími se vrstvami vazebných domén a elektrod nebo množinu podložek obsahujících jak vazebný povrch tak elektrodový povrch na jediné podložce. Toto provedení bude představovat trojrozměrné seskupení ECL analytických buněk. Všechny jmenované složky kazety jsou transparentní, případně s výjimkou určitých ploch mezi vazebnými doménami. Například lze na sebe navrstvit množinu transparentních vazebných povrchů, elektrodových povrchů a podložek.

První a druhá podložka mohou být ploché a orientované tak, že mezi sebou definují objem zadržující vzorek. Alternativně může mít první a druhá nosná vrstva jakýkoliv další vhodný tvar včetně sférického, krychlového a válcového za předpokladu, že se tyto dvě podložky a jejich libovolné další složky přizpůsobí tomuto tvaru. Obrázek 10 například ukazuje kazetu 1100, tvořenou dvěma sousedícími nerovnými podložkami 1102 a 1104. Tyto podložky mají vzájemně komplementární povrchy. Každá podložka může mít PMAMS povrch nebo seskupení množiny elektrod, nebo obojí. Jedna z podložek, nebo obě, může být elastomerní a

přizpůsobit se tvaru druhé podložky. Podložky nebo kazety mohou mít předem nařezaný formát nebo mohou být uvolňovány ve vhodné délce z rolového zásobníku. Kazeta může dále zahrnovat prostředek pro příjem vzorku a distribuční prostředek, například žlábký, kanálky, vruby apod..

Obrázek 37 znázorňuje kazetu, ve které jsou vazebné domény 3702 v a/nebo na matrici 3703, která se nachází na povrchu 3701. Druhý povrch 3700, který nese pracovní elektrodu 3704 a protielektrodu 3705 je uspořádán tak, aby se vazebné domény dostaly do těsné blízkosti pracovní elektrody. Za podmínek, které vedou ke generování světla na ECL značení navázaných na vazebných doménách lze světlo detekovat na jednom povrchu nebo na obou površích. Seskupení světelných detektorů 3706, například CCD seskupení, zesílené CCD seskupení nebo lavinové fotodiodové seskupení, se použije pro současné měření množiny světelných signálů na vazebných doménách. Světelné detekční seskupení zobrazuje světlo, generované na vazebných doménách. Ke zkvalitnění zobrazení lze použít čočky, reflektory a/nebo optické vodiče. U dalších provedení se světlo, detekované v zónách nebo oblastech světelných detektorů (například světelných detekčních pixelů), koreluje na vazebné domény. Korelaci detekovaného světla s vazebnými doménami lze pomoci použitím obrazové analýzy. U jednoho výhodného provedení je povrch elastomerní nebo přizpůsobivý a je tedy schopen vytvořit dokonalý kontakt s elektrodovými povrchy. Vazebné domény jsou navázány na polymery, které jsou schopny přenášet iontové proudy z protielektrody na pracovní elektrodu. U výhodnějšího provedení jsou objekty vodou zbobtnané polymery, které jsou

schopny přenášet iontový proud z protielektrody na pracovní elektrodu.

Obrázek 38 znázorňuje kazetu, ve které se vazebné domény 3805, 3806, 3807 nacházejí na površích distinktních objektů 3808, 3809, 3810, nesených protielektrodou 3800. Pracovní elektroda 3801 se nachází v blízkosti povrchu objektů. Za podmínek, které vedou ke generování elektrochemiluminiscence na TAG skupinách, navázaných na vazebných doménách, lze světlo detekovat skrze jednu nebo obě elektrody (pokud je jedna z elektrod nebo obě elektrody transparentní nebo polotransparentní) a/nebo ze strany. Seskupení světelných detektorů 3802 se použije pro současné měření množiny světelných signálů na jednotlivých vazebných doménách. Předměty mohou být elastomerní a/nebo přizpůsobivé a jsou tedy schopny vytvořit dokonalý kontakt s pracovní elektrodou. Objekty mohou být polymery, které jsou schopny přenášet iontové proudy z protielektrody na pracovní elektrodu. U výhodnějšího provedení jsou objekty vodou zbobtnané polymery, které jsou schopny přenášet iontový proud z protielektrody na pracovní elektrodu.

Transparentní podložka, obsahující jednu nebo více vazebných domén, je uvedena do kontaktu s elektrodou na bázi fibrilové matrice. Reakční činidla mohou proudit buď mezi podložkou/vazebnými doménami a fibrilovou maticí nebo skrze maticí k vazebným doménám. Světlo může procházet z vazebných domén skrze transparentní podložku k detektoru.

U dalšího výhodného provedení je elektroda potažena opticky průsvitnou nebo průhlednou vrstvou uhlíkových fibril, které zvyšují účinnou povrchovou plochu elektrody.

Výhodně jsou PMAMS podložky a/nebo kazety podle vynálezu baleny jako sady. Tato sada obsahuje jednu nebo více PMAMS podložek, připravených podle vynálezu, pro provádění ECL reakcí zahrnujících testy, kontroly atd.. Sada může případně zahrnovat reakční činidla včetně reakčních kontrolních činidel, ECL testovacích a kalibračních reakčních činidel apod.. Sada může dále zahrnovat reakční směs, která obsahuje množinu vazebných reakčních činidel, specifickou pro množinu různých analytů.

Zařízení pro provádění ECL reakcí

U jednoho provedení jsou PMAMS na podložkách a kazety obsahující tyto podložky navrženy tak, že mohou být vloženy do zařízení, jehož součástí je prostředek pro aplikaci jednoho nebo několika testovacích vzorků na PMAMS vazebné domény a iniciování množiny ECL reakcí. Taková zařízení lze odvodit z běžných zařízení a vhodnou modifikací podle vynálezu ho přizpůsobit provádění ECL testů, k nimž lze využít specifická provedení PMAMS. Zařízení pro provádění ECL reakcí popsal Zoski a kol. (patent US 5,061,445). Potřebné modifikace zahrnují poskytnutí podložky a/nebo manipulační kazety, dodávky množiny vzorků, množiny ~~elektrod zásobovaných zdrojem napětových vln~~ a prostředky pro získání a zpracování množiny ECL signálu.

Prvky příkladného zařízení podle vynálezu jsou znázorněny na obrázku 6A. Toto zařízení 700 zahrnuje horní a spodní podložku 702, 704 a elektrodovou ochranu 710. Horní podložka nese množinu párů elektrod a protielektrod (není znázorněna). Spodní podložka nese vazebné domény 706. Zařízení je schopno odstranit elektrodovou ochranu z kazety

a umístit elektrodový a protielektrodový pár do kontaktu s analytem, navázaným na vazebných doménách. Prostor 708, kterým proudí reakční činidlo nebo tekutina, sousedí s podložkou nesoucí vazebné domény. Zařízení je rovněž schopno souběžně nebo postupně zasílat identické napětové vlny nebo individuálně stanovenou napětovou vlnu každému z množiny elektrodo-protielektrodových párů a spustit tak ECL reakce v kazetě a následně změřit emitované ECL záření pomocí fotonového detektoru, například světelného detekčního prostředku. Zařízení může rovněž obsahovat tepelné regulační prostředky pro udržení požadované teploty podložky a/nebo kazety, nebo prostředí na podložce a pro nastavení teploty, optimální pro průběh ECL reakcí. Teplotními regulačními prostředky jsou topné a chladicí prostředky, například elektrické odporové topné prvky, chladicí ventilátory a chladicí prostředky a libovolné další zdroje pro ohřev nebo chlazení. Teplotně regulační prostředky rovněž zahrnují teplotní senzory, například termostat nebo zařízení na bázi termočlánků a prostředky pro spuštění a zastavení topných nebo chladících prostředků v závislosti na detekovaných teplotních změnách.

Zařízení rovněž poskytuje prostředky pro držení, pohyb a manipulaci s jednou nebo několika podložkami, nebo kazetami, v souvislosti s prováděním ECL reakcí. Zařízení může dále obsahovat stacionární nebo pohyblivý prostředek pro dodávku vzorku, jehož úkolem je umístit vzorek na PMAMS vazebné domény způsoby, popsány výše v souvislosti s popisem kazet.

Zařízení rovněž obsahuje elektrodový kontaktní prostředek, schopný elektricky propojit seskupení samostatně adresovatelných elektrodových spojů kazety s

elektronickým generátorem napětových vln, například potenciostatem (viz například obrázek 5, patent US 5,068,088). Vlnový generátor dopravuje signály postupně nebo současně a tak nezávisle spouští množinu ECL reakcí v kazetě.

V průběhu ECL testu může iontový proud, proudící mezi pracovní elektrodou a protielektrodou, proudit skrze iontově vodivou kapalinu (například vodu obsahující iontové soli), skrze tenkou vrstvu takové kapaliny a/nebo skrze iontově vodivou pevnou matici.

Zařízení pro měření elektrochemiluminiscence ve vzorku může tedy obsahovat množinu článků pro přidržení alespoň jednoho vzorku, přičemž každý článek může být tvořen jednou nebo více elektrodami a jednou nebo více protielektrodami a první podložkou, která obsahuje množinu diskrétních vazebných domén. Elektrody a protielektródy se mohou nacházet na povrchu první podložky nebo na povrchu druhé podložky, přičemž druhá podložka se nachází v těsné blízkosti vazebných domén na první podložce. Elektrody a protielektródy se mohou vyskytovat v párech. Článek může dále obsahovat množinu snímacích elektrod pro snímání napětí v sousedství pracovní elektrody. Kazeta může rovněž obsahovat článek, jehož součástí je referenční elektroda.

Zařízení dále obsahuje světelný detekční prostředek, schopný detekovat ECL reakce prováděné v kazetě, například pomocí jediného detektoru nebo množiny detektorů. Tyto detekční prostředky zahrnují například seskupení optických vláken, uspořádaných v zákrytu se seskupením elektrod a uspořádaných vedle tohoto seskupení, která jsou připojena k řadě fotodetekčních prostředků nebo k jedinému světelnému

detekčnímu prostředku, schopnému scanovat řadu emitovaných ECL signálů.

Zařízení případně obsahuje digitální počítač nebo mikroprocesor pro regulaci funkcí různých složek zařízení.

Zařízení dále obsahuje prostředek pro zpracování signálu. V jednom provedení tento prostředek pro zpracování signálu zahrnuje digitální počítač pro převedení, zaznamenání, analyzování a/nebo zobrazení výsledků jednotlivých ECL testů.

Zařízení může alternativně obsahovat elektrodový translační prostředek pro scanování jednoho nebo více elektrodo-protielektrodového páru na vazebném povrchu při postupném spouštění ECL.

V paralelním testu PMAMS mohou být rovněž použity velikostně exkluzní filtry.

ECL testy, které mohou být prováděny

ECL značení, která lze použít v rámci vynálezu, lze zvolit z v daném oboru známých ECL značení (viz již uvedená část, označená „Elektroluminescenční testy“ a patent US 5,310,687). ECL značení například může obsahovat organickou sloučeninu obsahující kov, ve které se kov zvolí ze skupiny zahrnující ruthenium, osmium, rhenium, iridium, rhodium, platinu, palladium, molybden, technicium a wolfram. Vhodná vazebná chemie pro přípravu ECL TAG reakčních činidel je dobře známa a popsána například Bardem a kol. (patent US 5,310,687 a 5,221,605). Navázání ECL

značení na vazebné reakční činidlo může být kovalentní a/nebo nekovalentní. ECL značení může být na vazebné reakční činidlo navázáno nekovalentně (například pomocí hydrofobních účinků nebo iontových interakcí). V dalších příkladech nekovalentního navázání se ECL značení váží (kovalentně nebo nekovalentně) ke komplexu, který je zase nekovalentně navázán na vazebné reakční činidlo. Například lze použít kovalentní navázání Ru(bpy)₃ přes vazebné činidlo na komplex Ni(II) a kyseliny trinitrilotrioctové. Tato molekula se naváže na vazebná reakční činidla, jejichž součástí je peptidová sekvence obsahující množinu histidinů. Podobným způsobem lze použít i další, v daném oboru známé, receptorové ligandové páry (Sassenfeld, 1990, TIBTECH, 8:88 až 93). Dále lze použít ECL značení, které obsahuje množinu organokovových sloučenin (například obsahujících ruthenium), uspořádaných ve formě větvené sítě (například pomocí sítě uhlovodíkových vazebných činidel). Tyto větvené sítě, které obsahují množinu organokovových zbytků, mohou být navázány do jednoho místa molekuly, která má být označena pomocí ECL nebo mohou být navázány do množiny poloh. U dalšího provedení je ECL značením, které obsahuje množinu organokovových sloučenin, lineární polymer s organokovovými skupinami, navázanými na řetězec polymeru v množině pozic podél délky tohoto řetězce (například lineární větvený nebo cyklický polymer).

Množinu vazebných domén lze použít v různých dalších, v daném oboru známých, formátech ECL testu. U kvantitativních testů se použije známé množství reakčního činidla, značeného pomocí ECL, a naměřené množství ECL se koreluje se známými standardy za účelem vypočítání množství přítomného analytu. Pro odborníky v daném oboru lze známými

metodami provádět přímé reverzní konkurenční a sendvičové testy. Konkurenční testy, například navržené pro kvantitativní stanovení množství sledovaného analytu v objemu vícesložkového kapalného vzorku, se provádí následujícím způsobem. Vazebný povrch se uvede současně do kontaktu se (a) známým množstvím ligandu, značeného pomocí ECL, který je schopen soupeřit se sledovaným analytem v navázání na vazebné reakční činidlo, které se nachází na vazebných doménách, a (b) vzorkem, u kterého se očekává, že bude obsahovat sledovaný analyt; přičemž zkontaktování se provede za podmínek, vhodných pro konkurenční navázání sledovaného analytu a ligandu na vazebné reakční činidlo. Přítomnost analytu ve vzorku bude redukovat množství konkurujícího ligandu značeného pomocí ECL, které se váže na vazebnou doménu a redukovat tak (v porovnání s případem, kdy není ve vzorku přítomen žádný analyt) výsledné množství ECL. ECL ve výsledné vazebné doméně se spustí a kvantitativně se stanoví množství emitovaného světla, čímž se kvantitativně stanoví množství sledovaného analytu, přítomného ve vzorku. Alternativně lze vzorek uvést do kontaktu s vazebným povrchem před uvedením vazebného povrchu do kontaktu s ligandem, označeným pomocí ECL, přičemž ligand, označený ECL, bude následně soupeřit s již navázaným analytem ze vzorku na PMAMS povrchu a nahradí určitou část již navázaného analytu. U dalšího provedení lze vzorek zpracovat tak, že bude obsahovat látky a molekuly, které jsou označeny pomocí ECL a standardní množství neoznačeného sledovaného analytu lze uvést do kontaktu s vazebným povrchem před zkontaktováním vazebného povrchu se vzorkem, nebo současně s uvedením vazebného povrchu se vzorkem, za účelem provedení konkurenčního testu.

U sendvičového testu je ligand, označený ECL, vazebným partnerem, který se specificky váže na druhý vazebný zbytek na sledovaném analytu. Takže pokud je ve vzorku přítomen analyt, který se specificky váže na vazebné reakční činidlo ve vazebné doméně PMAMS, potom se vytvoří „sendvič“, který je tvořen vazebným reakčním činidlem na vazebné doméně, navázaný na analyt ze vzorku, který se váže na vazebného partnera, označeného pomocí ECL. U dalšího typu konkurenčního sendvičového testu se samotné kopie analytu naváží na vazebné domény PMAMS před tím, než se tento povrch exponuje vzorkem. Vzorek se následně uvede do kontaktu s vazebným povrchem. Vazebný partner, značený pomocí ECL (který může být specificky navázán na analyt), se naváže na analyt v nepřítomnosti volného analytu (ze vzorku) v testovaném roztoku, ale pokud je tento volný analyt (ze vzorku) v testovaném roztoku přítomen, potom dojde ke konkurenční inhibici.

U alternativních provedení se používá sekvenční značení. U příslušného provedení sendvičového testu se například analyt, navázaný na vazebnou doménu, uvede postupně do kontaktu s množinou vazebných partnerů analytu, značených pomocí ECL. Při kontaktování s jednotlivými odlišnými vazebnými partnery se provádí ECL měření a případné promývání. Tímto způsobem lze provádět ECL měření různých vazebných zbytků analytu (například $CD8^+$, receptorové pozitivní T buňky a, b T buněčného antigenu). Dále lze použít množinu ECL značení, z nichž každé emituje světlo při odlišitelné vlnové délce pro navázání na různá vazebná reakční činidla, specifická pro různé zbytky analytu. Dále lze například pro rozlišení $CD4^+$, a, b T buněčné antigenové receptorově pozitivní buňky od $CD8^+$, a,

b T buněčné antigenové receptorově pozitivní buňky použít množinu rozlišitelných reporterových prostředků (například ECL značení, fluorescenční značení a značení s navázaným enzymem), kdy každý z těchto prostředků se naváže na jiné vazebné reakční činidlo, specifické pro jiný vazebný zbytek analytu.

U výhodných provedení vazebné domény obsahují značené proteiny a/nebo nukleové kyseliny a/nebo buňky a/nebo chemické druhy. Takto značené složky (například pomocí ECL značení) lze přidat k vazebné doméně během její přípravy před zahájením testů, v průběhu testů a/nebo před ukončením testů. Během doby lze například v různých časových okamžicích přidat množinu označených složek a následně provést odečty. Tyto odečty mohou poskytnout souhrnnou informaci. U dalšího provedení mohou být vazebné domény PMAMS použity vícekrát. Po provedení daného testu se povrch může omýt za podmínek, které obnoví aktivitu jedné nebo více vazebných domén PMAMS povrchu. Některé vazebné reakce lze vrátit změnou iontové síly reakčního roztoku. Alternativně lze pro rozštěpení vazebných komplexů použít teplo. Některé vazebné domény se mohou obnovit samy. Vazebné domény, které obsahují katalytické (například enzymatické) funkční skupiny, mohou být použity více než jednou. Vazebné domény se používají kontinuálně a mohou být tedy použity při biosenzorových aplikacích.

Dále lze test formátovat tak, že je vazebné reakční činidlo, navázané na PMAMS elektrochemiluminiscenčně značeno. Po navázání určitých chemických analytů ve vzorku se bude kvantitativně modulovat ECL signál. ECL značené vazebné činidlo, navázané na povrchu, může být specifické pro analyt na buněčném povrchu, například antigeny, jakými

jsou alfa a beta T buněčné anigenové receptorové antigeny nebo CD4 nebo CD8 antigeny. Po exponování směsi buňkami budou buňky, navázané na povrch, stericky bránit elektrodovému povrchu, který je uveden do blízkosti PMAMS, v excitaci ECL značeného vazebného činidla a budou tak snižovat ECL signál.

Prováděné testy mohou být homogenní nebo heterogenní. U heterogenních testů se před vystavením navázaného nebo nenavázaného značeného reakčního činidla elektrickému potenciálu nenavázané značené reakční činidlo odstraní z navázaného značeného reakčního činidla (například promýváním). U homogenních testů se nenavázané značené reakční činidlo a navázané značené reakční činidlo exponují elektrickým potenciálem současně. U homogenních testů je intenzita nebo spektrální charakteristiky signálu, emitovaného navázaným značeným reakčním činidlem, buď větší než intenzita signálu, emitovaného nenavázaným značeným reakčním činidlem, nebo menší než tato intenzita. Přítomnost nebo nepřítomnost navázaných, resp. nenavázaných, složek lze stanovit na základě měření rozdílu intenzity.

Po ukončení kontaktování vazebných reakčních činidel s analytem nebo jeho konkurentem a jeho libovolnými vazebnými partnery se zajistí, aby ECL značení bylo vystaveno prostředí, způsobujícímu elektrochemiluminescenci. Vhodná ECL testovací média jsou v daném oboru známa. Tato testovací média výhodně obsahují molekulu, která podporuje elektrochemiluminescenci ECL značení. Tyto molekuly zahrnují neomezujícím způsobem oxalát, NADH, přičemž nejvýhodnější je tripropylamin. Tuto „promotorovou“ molekulu lze poskytnout volně v roztoku a nebo ji lze

předem navázat nebo jinak připravit (například jako produkt chemické reakce) na PMAMS povrchu jako monovrstvu na povrchu, vazebnou doménu, elektrodový povrch, vazebné reakční činidlo a/nebo ECL značení atd.. Pokud médium, obklopující ECL značení navázané na vazebných doménách při kontaktních krocích, vede k ECL, potom není zapotřebí toto médium měnit. Alternativně lze médium upravit nebo nahradit tak, aby poskytovalo médium vedoucí k ECL. Jakmile je elektroda a protielektroda přiblížena k vazebné doméně nebo se uvede do kontaktu s vazebnou doménou, dojde k aplikaci napěťové vlny a detekování nebo měření ECL.

U výhodného provedení vynálezu se výše popsané kroky, zahrnující kontaktování vazebných reakčních činidel s analytem nebo jeho konkurentem a libovolnými vazebnými partnery, provádí v nepřítomnosti elektrod a protielektrod, tzn. že vzorek není v kontaktu s elektrodou nebo protielektrodou. Po ukončení těchto kontaktních kroků se elektrody a protielektrody umístí dostatečně blízko ECL značení, navázaného na vazebné doméně, pro spuštění ECL reakce.

Podložka s PMAMS může být použita pro sekvencování řetězců nukleových kyselin. Pro přípravu PMAMS s množinou vazebných domén lze použít různé oligonukleotidové sondy známých nukleotidových sekvencí jako vazebná reakční činidla v různých vazebných doménách. To znamená, že různé vazebné domény budou obsahovat vazebná reakční činidla různých známých nukleotidových sekvencí. Oligonukleotidový řetězec, nebo fragmenty oligonukleotidového řetězce, který se má sekvencovat, se následně nechají navázat (hybridizovat) na PMAMS vazebné doméně. Vazebné testy se provádí na PMAMS a distribuce ECL signálů z diskrétních

vazebných domén na PMAMS se použije pro sekvencování oligonukleotidové sekvence.

Výše popsaná metoda se zakládá na schopnosti krátkých oligonukleotidů hybridizovat se na komplementární, nebo v podstatě komplementární, sekvenci v jiné molekule nukleové kyseliny (viz například Strezoska a kol., 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 1089 až 1093; Bains, 1992, *Bio/Technology* 10: 757 až 58). Podmínky mohou být zvoleny tak, aby se dosáhlo požadovaného stupně sekvenční komplementarity, nezbytného pro úspěšnou hybridizaci. Hybridizace DNA molekuly neznámé sekvence na sondu předem stanovené sekvence detekuje přítomnost komplementární sekvence v DNA molekule. Tato metoda se výhodně praktikuje tak, že se provádí hybridizační reakce s oligonukleotidovými sondami, navázanými na vazebných doménách, a vzorkem DNA v roztoku.

PMAMS lze rovněž použít pro izolaci screenování a/nebo výběr nové molekuly nebo komplexu s požadovanou funkcí (například vazností nebo katalýzou). PMAMS lze použít pro izolaci sloučenin a/nebo olověných sloučenin pro terapeutické účely. PMAMS, obsahující množinu peptidů, nukleových kyselin, virových vektorů nebo polymerů, syntetizovaných pomocí různých kombinatorických chemií, lze připravit za použití způsobů podle vynálezu. Pro rychlé screenování vazebnosti, například k ECL značenému celulárnímu receptoru, lze použít široké spektrum podložek s takto ošetřeným PMAMS. U jednoho způsobu se nejprve použije PMAMS s velkou diverzitou nepříbuzných peptidových sekvencí pro izolaci peptidových sekvencí vážících olovo. Následně se použije PMAMS s peptidy sekvencí příbuzných sekvencemi, které vykazují vaznost ke sledované molekule

(například celulárnímu receptoru) na prvním PMAMS. Tento postup se opakuje, dokud se nenalezne peptid s požadovanými vazebnými vlastnostmi.

Sledovaným analytem může být například celá buňka, subcelulární částice, vir, prion, viroid, nukleová kyselina, protein, antigen, lipoprotein, lipopolysacharid, lipid, glykoprotein, karbohydrátový zbytek, derivát celulózy, protilátka nebo její fragment, peptid, hormon, farmakologické činidlo, buňka nebo buněčné složky, organické sloučeniny, nebiologický polymer, syntetická organická molekula, organokovové sloučeniny nebo anorganická molekula přítomná ve vzorku.

Vzorek lze například odvodit z pevné látky, emulze, suspenze, kapaliny nebo plynu. Dále lze vzorek odvodit například z tělních tekutin nebo tkání, vody, potravy, krve, séra, plazmy, moči, výkalů, tkáně, slin, olejů, organických rozpouštědel nebo vzduchu. Vzorky mohou obsahovat redukční nebo oxidační činidla.

Testy prováděné pomocí vynálezu zabudováním vazebného reakčního činidla, specifického pro uvedené látky, do vazebných domén vazebných povrchů podle vynálezu, lze použít pro detekci nebo měření následujících látek a okolností: albuminu, alkalické fosfatázy, alt/SGPT, amoniaku, amilázy, AST/SGOT, bilirubinu-celkem, dusíku v krvi, vápníku, oxidu uhličitého, chloridu, cholesterolu-celkem, kreatininu, GGT, glukózy, HDL cholesterolu, železa, LDH, hořčíku, fosforu, draslíku, proteinu-celkem, sodíku, triglyceridů, kyseliny močové, drogové závislosti, hormonů, modulátorů kardiovaskulárního systému, nádorových markerů, antigenů infekčních onemocnění, antigenů vyvolávajících

alergii, imunoproteinů, cytokinů anemie a metabolických markerů, carbamazepinu, digoxinu, gentamicinu, lithia, fenobarbitálů, fenytoinů, prokainamidů, chinidinu, theofyllinu, tobramycinu, kyseliny valproové, vankomycinu, amfetaminu, antidepresiv, barbiturátů, benzodiazepinů, kannabinoidů, kokainu, LSD, methadonu, methaqualonu, opiátů, fenylindinu, propoxyfenu, ethanolu, salicylátu, acetaminofenu, estradiolu, progesteronu, testosteronu, hCG/bhCG, hormonu stimulujícího folikul, luteinizačního hormonu, prolaktinu, thyroidových hormonů jako například hormonu stimulujícího thyorid, T4, TUP, kompletního-T3, volného-T4, volného-T3, kortisolu, kreatininkinázy-MB, kompletní-kreatininkinázy, PT, APTT/PTT, LD ISOs, kreatininkinázy ISOs, myoglobinu, myo lehký řetězec, troponinu 1, troponinu T, chlamydii, gonorei, oparového viru, Lidského onemocnění, Epstein-Barrova viru, IgE, Rubelly-G, Rubbely-M, CMV-G, CMV-M, toxo-G, toxo-M, HBsAg (virový povrchový antigen hepatitidy B), HIV 1, HIV 2, anti-HBc, anti-HBs, HCV, anti-HAV IgM, anti-HBc IgM, anti-HAV, HBeAg, anti-HBeAg, TB, antigenu specifického pro prostatu, CEA, AFP, PAP, CA125, CA15-3, CA19-9, b2-mikroglobulinu, hemoglobinu, červených krvinek, HBCAb, HTLV, ALT, STS-syfilisu, antigenu ABO krevního typu a antigenů dalších typů krve, cytomegaloviru, feritinu, B-12, folátu, glykalátovaného hemoglobinu, amfetaminu, antidepresiv a dalších psychotropních farmaceutik.

Měření ECL na různých vazebných doménách lze provádět sekvenčně nebo současně.

PMAMS, specifický pro sledovaný analyt, tj. buněčný povrchový protein, se nejprve exponuje vzorkem obsahujícím buňky, u kterého se má stanovit počet buněk ve vzorku.

U výhodného provedení se známý objem vzorku a/nebo naředený vzorek exponuje PMAMS, který má množinu vazebných domén, specifických pro alespoň jeden antigen buněčného povrchu. Navázané buňky lze následně kvantifikovat přichycením sekundární vazebné skupiny, navázané na ECL zakončení. Touto sekundární vazebnou skupinou je skupina, schopná vzájemně reagovat se širokou škálou buněčných typů, například ECL zakončení, navázané na hydrofobní skupinu, kterou lze zavést do buněčné membrány, nebo na lektin, orientovaný proti cukrům buněčného povrchu. ECL zakončení je navázáno na sekundární protilátce, orientované proti protilátce buněčného povrchu. U konkrétnějšího provedení může být několik buněčných typů navázaných na stejnou doménu rozlišeno použitím množiny sekundárních protilátek, označených pomocí ECL zakončení. To přednostně zajistí, že počet diskrétních vazebných domén, specifických pro daný analyt na povrchu buňky, překročí průměrný počet buněk ve vzorku, které se naváží. Pro stanovení počtu buněk na objem vzorku se následně použily statistické metody. Tuto techniku lze rovněž použít pro stanovení počtu dalších částic, například virů, pokud se použije vazebné reakční činidlo, specifické pro antigen na viru. Domény mohou být v porovnání s velikostí buněk malé. V tomto případě se na doménu naváže pouze jedna buňka a to vede k vytvoření digitálního signálu pro každou doménu. Domény mohou být v porovnání s velikostí buňky velké. V tomto případě se na doménu naváže množina buněk a úroveň signálu, vysílaného z každé domény, lze kalibrovat tak, aby se získal počet buněk na objem vzorku. Pro stanovení počtu buněk a pro stanovení buněčné morfologie lze použít zobrazovací analýzu,

využívající seskupení světelných detektorů (například CCD kameru nebo lavinové fotodiodové uspořádání).

Vynález výhodně rovněž poskytuje způsoby provádění ECL reakcí, například testů při rychlosti 1 000 ECL reakcí v průběhu 5 až 15 minut.

PMAMS pro použití s dalšími analytickými metodami a/nebo ECL

Výše popsané techniky pro detekci, založené na elektrochemiluminescenci, lze použít ve spojení s dalšími testovacími technikami, například s technikami využívajícími domény, na kterých mohou probíhat katalýzy a další chemické reakce. Diskrétní vazebné domény podle vynálezu lze použít v dalších zkušebních technikách, jakými jsou například klinické chemické testy, například stanovování elektrolytu, klinické stanovování enzymu, zjišťování krevního proteinu, určování glukózy, moči a kreatinu apod.. Další určovací techniky, které lze zkombinovat s ECL testy a/nebo použít samotné, spolu s PMAMS podle vynálezu, zahrnují chemiluminescenční značení, fluorescenční testy, testovací systémy s navázaným enzymem, elektrochemické testy (viz například Hickman a kol., 1991, Science 252:688 až 691) a/nebo testovací systémy, využívající rezonanční detekce, například povrchové plasmonové nebo akustické techniky.

Lze použít PMAMS podložky s kapkami, ve kterých probíhá množina různých chemických reakcí. Každá kapka může obsahovat jiná vazebná činidla a/nebo jiné chemické testy (například reakční médium). Kapky mohou být například

hydrofilní a mohou spočívat na hydrofilních vazebných doménách, které jsou obklopeny hydrofobními povrchovými oblastmi. Tyto kapky jsou chráněny hydrofobním roztokem, pokrývajícím povrch. Hydrofilní roztok, který má být testován, se nanese na druhý PMAMS s hydrofilními vazebnými doménami, obklopenými hydrofobními oblastmi. Tyto dva povrchy se přiblíží tak, aby se hydrofilní domény na protilehlých površích dostaly do kontaktu a provede se spektrální analýza, která detekuje reakční produkty chemických testů.

Fibrilové matrice lze vzorovat tak, aby tvořily množinu diskrétních hydrofobních nebo hydrofilních domén, obklopených hydrofilními, resp. hydrofobními doménami. Na hydrofilních oblastech mohou spočívat kapky vodných roztoků, obsahujících vazebná reakční činidla, které mohou být vymezeny hydrofobními oblastmi. Tyto kapky mohou obsahovat například fibrily, agregáty fibril, vazebná reakční činidla, ECL reakční činidla, reakční činidla pro testy, povrchově aktivní činidla, polyethylenglykoly, detergenty a množinu výše zmíněných biologických molekul a/nebo jejich kombinace.

Hydrofobní roztok, překrývající první PMAMS, se řízeně odstraní (například odpařením, vztlínáním) tak, že odkryje pouze část hydrofilních kapek na povrchu okolního prostředí. Hydrofilní roztok, u kterého se určují optické chemické reakce, se následně exponuje PMAMS povrchem, hydrofilními mikrokapslemi, smísí a analyzuje (například pomocí spektrální analýzy).

PMAMS vazebné domény lze použít jako předfiltr nebo filtr. Samotný celulárně specifický PMAMS lze například

použít v určitých případech jako filtr pro určité buněčné typy. Tento celulárně specifický PMAMS lze rovněž použít ve spojení s velikostně vylučovacím filtrem. Výsledný analytický roztok se následně exponuje PMAMS, specifickým pro subcelulární částicovou látku (například viry). Částicový subcelulární PMAMS a/nebo velikostně vylučovací filtr se použije pro generování analytického roztoku malé molekuly (například proteinu, malých chemických entit). Použitím sériového PMAMS testovacího systému lze analytický roztok postupně vyčistit a tím redukovat nespecifické interakce analytu.

Pro dosažení požadovaných vlastností lze měnit optickou neprůhlednost materiálu, použitého pro výrobu podložky elektrody a/nebo vazebné domény. Použitý materiál může být průsvitný, průhledný nebo v podstatě neprůhledný, v závislosti na tloušťce, složení a/nebo optické hustotě materiálu.

Optická neprůhlednost fibrilových matic roste s rostoucí tloušťkou matrice. Velmi tenké matrice jsou opticky průsvitné, silnější matrice mohou být v podstatě neprůhledné. V některých příkladech jsou matrice, jejichž tloušťka se pohybuje od 0,01 μm do 0,5 μm , v podstatě průsvitné. U dalších příkladů jsou matrice s tloušťkou větší než 20 μm v podstatě neprůsvitné. Matrice s tloušťkou 0,5 μm až 20 μm mají průměrnou neprůhlednost, která se zvyšuje s tloušťkou fibrilové matrice. Optická neprůhlednost příslušné tloušťky matrice může záviset na složení, hustotě, modifikaci, počtu vrstev, typu a množství materiálů, rozptýlených v matrici a/nebo jejich kombinací. Rovněž může záviset na vlnové délce použitého světla.

Pokud je materiál v podstatě průsvitný při dané tloušťce a v podstatě neprůhledný pro jinou tloušťku, potom může světlo, emitované z určité hloubky materiálu, materiálem procházet, zatímco světlo, vysílané z jiné (například větší) hloubky, může být materiálem v podstatě absorbováno nebo rozptýleno. U jednoho provedení umožňuje proměnlivá neprůhlednost materiálu použít tento materiál jako optický filtr.

Světlo, emitované z určité hloubky fibrilové matrice, může matricí v podstatě procházet a může být zaznamenáno detektorem, umístěným na povrchu fibrilové matrice nebo v jeho blízkosti. Světlo, emitované z jiné hloubky, může být matricí v podstatě absorbováno a/nebo rozptýleno a není tedy zjistitelné detektorem, umístěným na povrchu matrice nebo v jeho blízkosti. Tuto vlastnost fibrilové matrice (a/nebo opticky podobných materiálů) lze využít pro rozlišení navázaných a nenavázaných reakčních činidel v ECL testu.

Určitá reakční činidla mohou pronikat (aktivně nebo pasívně), být tažena (například vakuovou filtrací a/nebo vztlínáním) nebo tlačena tlakem do dostatečné hloubky v porézním materiálu, ve které je emise světla z těchto reakčních činidel podstatnou měrou nebo zcela absorbována nebo rozptýlena matricí. U jednoho provedení působí fibrilová matrice jak jako fyzikální tak jako optický filtr skrze který určitá reakční činidla prochází, určitá reakční činidla jsou zachycena a/nebo určitá reakční činidla se naváží na velmi tenkou vrstvu na povrchu matrice nebo v jeho blízkosti. Reakční činidlo, navázané na jednu nebo více vazebných domén a/nebo druhy, navázané na jednu nebo více vazebných domén (tyto domény jsou umístěny buď na

povrchu fibrilové matrice nebo ve velmi tenké vrstvě v blízkosti povrchu a v blízkosti matrice na PMAMS). Jejich navázání brání v pronikání, vtažení, vtlačení atd. do matrice a/nebo skrze tuto matici. Reakční činidla a/nebo další roztoky jsou aplikovány nebo vypouštěny na povrch fibrilové matrice tak, že se reakční činidla váží pouze na velmi tenkou vrstvu na povrchu matrice. Reakční činidla mohou být z matrice vymyta, jednou nebo několikrát, v jednom nebo více směrech. Reakční činidla se mohou vázat na fibrilovou matici, jednu nebo více vazebných domén, další nebo stejná reakční činidla navázaná na jedné nebo více vazebných doménách a/nebo mohou být zachycena uvnitř matrice a/nebo mohou procházet touto maticí.

Porézní materiály, použité pro výrobu podložek a/nebo elektrod mohou sestávat z více než jedné vrstvy, přičemž horní vrstva má vazebné domény a další vrstvy uvnitř matrice tyto vazebné domény nemají. U jednoho provedení fibrilové matrice (schematicky znázorněné na obrázku 29) je horní vrstva 2900 dostatečně silná, aby zabránila průniku světla, které vzniká ve vrstvě (vrstvách) 2901, 2902 matrice, ležící pod touto vrstvou. Světlo 2903, které emitují zdroje 2904, 2905 navázané na tuto horní vrstvu, lze detekovat detektorem 2906, umístěným na povrchu matrice nebo v jeho blízkosti. Světlo, pocházející ze zdrojů 2907, 2908 a 2909 ve spodních vrstvách 2901, 2902, je absorbováno a/nebo rozptýleno některou z vrstev nebo všemi vrstvami a nemůže být detektory 2906 a 2910 detekováno.

Pro zvolení příslušných velikostí, typů, derivátů fibril a/nebo fibrilových agregátů lze před výrobou matrice použít filtrační krok. Filtračním činidlem, použitým pro

filtraci suspenze fibril, je matrice fibril s určitou pórovitostí nebo s množinou pórovitostí.

Pórovitý materiál, například fibrilová matrice, může být použit jako podložka pro vazebné domény, elektroda, která může být použita pro ECL nebo další elektrochemické aplikace, filtr, který může být použit pro řízenou dodávku reakčních činidel a/nebo optický filtr, který může různou měrou přenášet, absorbovat a/nebo rozptylovat světlo.

Elektrochromové ECL zobrazovací panely

Vynález rovněž poskytuje způsob výroby izolovaných elektrochemických pixelů, použitelných v plochých zobrazovacích panelech. Litografické techniky, které byly navrženy pro výrobu plochých zobrazovacích panelů fungujících na elektrochromové a elektrochemiluminescenční bázi tvoří pixely, které mají v případě, že jsou elektronicky adresovány omezený vliv na sousední pixely (tj. omezený přeslech) (viz patent US 5,189,549). Omezením litografické techniky, navržené pro redukci tohoto přeslechu, je nutnost použití elektrolytického materiálu, který je schopen měnit svou vodivost po expozici světlem. Znakem předloženého vynálezu je redukce přeslechu mezi pixely bez nezbytnosti použití materiálů schopných světelně indukované modulace vodivosti, což umožní použít celou řadu různých roztoků, gelů nebo fólií.

Dva elektrodové povrchy, které tvoří aktivní oblast pixelu, se nachází na dvou k sobě přivrácených površích, majících sendvičovou konfiguraci. Elektrodové povrchy jsou potaženy komplementárně elektrochromovými materiály.

Redukce přeslechu lze dosáhnout vložení vodivé elektrolytické fólie mezi elektrodové povrchy s nevodivými oblastmi mezi jednotlivými elektrodovými páry (tj. mezi pixelovými prvky). Pokud jsou potažené elektrodové povrchy hydrofilní, potom jsou oblasti povrchu okolo elektrod hydrofobní (této struktury lze dosáhnout například pomocí ražení nebo nanášení přes masku) a hydrofilní vodivé kapky se nanesou na elektrodu na prvním povrchu, načež se druhý povrch zarovná a kontaktuje s prvním povrchem tak, že se elektrody ocitnou v zákrytu. Elektrolytické kapky se mohou tedy omezovat pouze na oblast uvnitř jednoho pixelu a není zapotřebí použít vodivý materiál mezi jednotlivými pixely. Elektrodové páry pixelů leží vedle sebe v těsné blízkosti na stejném povrchu. Pokud jsou potažené elektrodové páry hydrofilní, potom je plocha, obklopující obě elektrody, hydrofilní s hydrofobním kruhem okolo hydrofilní elektrodové plochy (této struktury lze dosáhnout pomocí ražení nebo nanášení přes masku). Kapky, popsané ve dvou výše uvedených provedeních, jsou stabilizovány hydrofobními roztoky. Viskozitu roztoků lze zvýšit zvýšením stability kapkového uspořádání. Hydrofilní a hydrofobní oblasti lze zaměnit. U dalších provedení mohou kapky obsahovat roztoky, schopné polymerovat a zvyšovat tak stabilitu a/nebo vodivost (například vodivé polymery) fólie mezi elektrodovými páry nebo nad elektrodovými páry. Pro omezení přeslechu mezi pixely lze dále použít strukturní znaky. Pro izolaci elektrolytických roztoků, gelů nebo filmů mezi pixely lze například použít elastomerní otisk (například poly(dimethylsiloxan)), který bude obklopovat vedle sebe umístěné elektrodové pixelové páry. Alternativně lze vedle sebe ležící elektrodové pixelové páry umístit do elektricky izolačních jamkových struktur na povrchu, elektrolytických

roztoků, gelů nebo filmů, do jamek nad uvedené elektrody a celý povrch, nebo potáhnout tak, aby izolovaly a obsahovaly elektrolytické složky jednotlivých pixelů.

PMAMS použitelný v dalších chemických reakcích

PMAMS podle vynálezu lze rovněž použít k provádění chemických reakcí bez využití elektrochemiluminescence. Lze například použít všechny techniky a testy, s výjimkou elektrochemiluminescenčních testů, popsané v části, označené „PMAMS pro použití s dalšími analytickými metodami a/nebo ECL“.

Kazeta pro detekování nebo měření sledovaného analytu ve vzorku podle vynálezu obsahuje: (a) první podložku, která má na svém povrchu, tvořícím alespoň jeden vazebný povrch, množinu diskrétních vazebných domén, z nichž alespoň část má jiná vazebná specifika než ostatní vazebné domény, přičemž každá z množiny diskrétních vazebných domén je hydrofilní a obklopena hydrofobními oblastmi; a (b) druhou podložku, která má na svém povrchu, tvořícím testovací povrch, množinu hydrofilních domén obsahujících reakční médium vhodné pro provádění chemického testu, přičemž množina diskrétních vazebných domén a množina reakčního média může být uvedena do kontaktu, při němž se vzorek, který má být analyzován, a který se nachází na jednotlivých vazebných doménách, dostane do styku s reakčním médiem za účelem detekce nebo měření sledovaného analytu. Alternativně mohou být vazebné domény hydrofobní a druhá podložka může mít na svém povrchu množinu hydrofobních domén, obsahujících reakční médium.

Vynález rovněž poskytuje způsob detekce nebo měření sledovaných analytů ve vzorku, který zahrnuje (a) umístění kapek vzorku obsahujícího analyt, který má být detekován nebo měřen, na množinu diskrétních vazebných domén na nosném povrchu, která obsahuje alespoň jednu vazebnou doménu, jejíž součástí jsou vazebná reakční činidla, která jsou vzájemně identická a která se liší svou specifičností od vazebných reakčních činidel, obsažených v ostatních vazebných doménách, přičemž každá z diskrétních vazebných domén je charakterizována buď jako hydrofobní nebo jako hydrofilní pod podmínkou, že oblast nosného povrchu, obklopující každou vazebnou doménu je (i) hydrofobní, pokud je vazebná doména hydrofilní a (ii) hydrofilní, pokud je vazebná doména hydrofobní, což umožní jednomu nebo více sledovaným analytům ve vzorku navázání na vazebné domény; a (b) uvedení kapek na první podložce do styku s povrchem druhé podložky mající množinu diskrétních hydrofilních domén, které obsahují reakční médium vhodné pro provádění chemického testu; a (c) určení přítomnosti sledovaných analytů, které se navázaly na vazebnou doménu.

Vynález rovněž poskytuje způsob detekce nebo měření sledovaných analytů ve vzorku, který zahrnuje (a) umístění kapek vzorku obsahujícího analyt, který má být detekován nebo měřen, na množinu diskrétních vazebných domén na nosném povrchu, která obsahuje alespoň jednu vazebnou doménu, jejíž součástí jsou vazebná reakční činidla, která jsou vzájemně identická, a která se liší svou specifičností od vazebných reakčních činidel, obsažených v ostatních vazebných doménách, přičemž každá z diskrétních vazebných domén je charakterizována buď jako hydrofobní nebo jako hydrofilní pod podmínkou, že oblast nosného povrchu,

obklopující každou vazebnou doménu, je (i) hydrofobní, pokud je vazebná doména hydrofilní a (ii) hydrofilní, pokud je vazebná doména hydrofobní, což umožní jednomu nebo více sledovaným analytům ve vzorku navázání na vazebné domény; a (b) umístění kapek reakčního média na kapky vzorku; a (c) stanovení přítomnosti sledovaných analytů, které se navázaly na vazebnou doménu.

U konkrétního příkladu tohoto aspektu vynálezu jsou vazebné domény z nichž každá má v sobě zabudovaný jiný enzym, který se použije jako substrát sekvenčního meziprojektu v chemické reakci, umístěny na PMAMS povrchu tak, že produkt dané enzymatické reakce, který je reakčním činidlem pro následný enzym, proudí k následujícímu enzymu na reakční dráze. Vynález rovněž poskytuje objemovou imobilizaci enzymu na samočinně se sestavujících monovrstvách, určených například pro průmyslové aplikace, přičemž k této imobilizaci se používají výše popsané metody.

Desky s takto imobilizovanými enzymy na jedné nebo na obou stranách lze například naskládat na sebe a dosáhnout tak vysokých poměrů povrchové plochy a objemu roztoku. Dodatečně lze takto imobilizované enzymy přichytit k porézním materiálům. Dále se takto imobilizované enzymy mohou vyskytovat na ponorných měrkách, míchadlech, stěnách trubíc nebo kapilár nebo na stěnách nádob, například komory inkubátoru.

U alternativního aspektu vynálezu se výše popsané neelektrochemiluminescenční testy mohou provádět na PMAMS analozích, které se liší od výše popsaných PMAMS tím, že obsahují diskrétní domény pro provádění neelektro-

chemiluminescenčních reakcí, které v sobě nemusí mít zabudováno vazebné reakční činidlo a nemusí být tedy vazebnými doménami. Tyto PMAMS analogy mají diskrétní domény pro provádění reakcí a jsou připraveny tak, aby inhibovaly šíření a/nebo rozptylování kapaliny, aplikované na diskrétní domény. U jednoho provedení jsou domény buď hydrofobní nebo hydrofilní, vzhledem k okolním oblastem na nosném povrchu, což napomáhá udržení reakčního média a/nebo vzorku v diskrétních doménách. K zamezení rozšiřování nebo rozptylování reakčního média nebo vzorku lze použít jamky, plstěné nebo porézní materiály, ukládání a sušení reakčního média nebo vzorku na gelech, filmech atd.. Průměr každé z těchto domén je menší než 1 mm a šířka se výhodně pohybuje v rozmezí od 50 nm do 1 mm, nejvýhodněji v rozmezí od 1 μ m do 1 mm. Na jednotlivé diskrétní domény lze před aplikací vzorku nanést stejné nebo odlišné reakční médium, nebo může aplikace vzorku předcházet nanášení reakčního média.

U výhodného provedení použití PMAMS analogů při provádění neelektrochemiluminescenčních testů se kapky reakčního média umístí na množinu diskrétních domén, výhodně současně, pomocí množiny mikroskopických kapalinových vodičů; a následně se případně pro zvýšení stability a/nebo ochrany kapky umístí na reakční médium nebo mezi diskrétní doménu a reakční médium viskóznější roztok (například olej); a následně se na jednotlivé domény aplikuje vzorek obsahující analyt, určený pro detekci nebo měření, přičemž se vzorek aplikuje buď diskrétně na jednotlivé diskrétní domény nebo v objemu vystavením celého povrchu PMAMS analogu obsahujícího domény, kapalnému vzorku. Výsledné reakce ve vazebných doménách se nechají proběhnout a výsledky se sledují pomocí záznamového a

detekčního systému, zvoleného ze systémů v daném oboru známých.

Vynález bude dále podrobněji popsán v následujících příkladech, které nikterak neomezují rozsah vynálezu, jenž je jednoznačně stanoven přiloženými patentovými nároky.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Příprava MAB PMAMS povrchů mikroražením

Známymi postupy se připravila exponovaná a vyvolaná fotorezistentní matrice o tloušťce 1 až 2 μm se čtvercově uspořádaným vzorem. Směs SYLGARD silikonového elastomeru 184 (poly(dimethylsiloxan) od společnosti Dow Corning) a odpovídajícího SYLGARD 184 vytvrzovacího činidla (10:1) se nalila na matrici a nechala vytvrdit. Zpolymerovaný SYLGARD 184 se opatrně sejmul ze silikonové matrice. Výsledné elastomerní razítko se „smáčelo“ hydrofilním alkanthiolem s OH koncovou skupinou, $\text{SH}(\text{CH}_2)_{11}=(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_6\text{OH}$, v ethanolovém roztoku (1 až 10 mM) a pomocí robotu uvedlo do kolíky vymezeného kontaktu se zarovnaným zlatým povrchem a sejmulo. Podložka se následně oplachovala několik sekund (například 2 až 10 sekund) roztokem hydrofobního alkanthiolu s methylovou koncovou skupinou, $\text{SH}(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_3$ (1 až 10 mM v ethanolu) (Kumar a kol., viz výše a Prime a kol., Science 252:1164 až 7). Výsledný povrch se potom mírně vysušil pod proudem dusíku.

Kapilární seskupení, obsahující hydrofilní roztoky, se následně pomocí robotu uvedlo do kolíky vymezeného kontaktu se zarovnaným povrchem, při kterém se kapiláry dostaly do zákrytu s $\text{SH}(\text{CH}_2)_{11}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_6\text{OH}$ doménami. Každá z kapilár obsahovala monoklonální protilátky (MABs), specifické pro sledovaný analyt, které jsou schopny kovalentně se navázat přes amidovou vazbu na reakční OH skupinu hydrofilních domén.

Příklad 2

Příprava MAB a nukleově kyselinového PMAMS povrchu mikroražením

Známými postupy se připravila exponovaná a vyvolaná fotorezistentní matrice o tloušťce 1 až 2 μm se čtvercově uspořádaným vzorem. Směs SYLGARD silikonového elastomeru 184 a odpovídajícího SYLGARD 184 vytvrzovacího činidla (10:1) se nalila na matrici a nechala vytvrdit. Zpolymerovaný SYLGARD 184 se opatrně sejmulo ze silikonové matrice. Výsledné elastomerní razítko se „smáčelo“ hydrofilním alkanthiolem s OH koncovou skupinou, $\text{SH}(\text{CH}_2)_{11}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_6\text{OH}$, v ethanolovém roztoku (1 až 10 mM) a pomocí robotu uvedlo do kolíky vymezeného kontaktu se zarovnaným zlatým povrchem a sejmulo. Podložka se následně oplachovala několik sekund (například 2 až 10 sekund) roztokem hydrofobního alkanthiolu s methylovou koncovou skupinou, $\text{SH}(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_3$ (1 až 10 mM v ethanolu) (Kumar a kol., viz výše a Prime a kol., Science 252:1164 až 7). Výsledný povrch se potom mírně vysušil pod proudem dusíku. Kapilární seskupení, obsahující hydrofilní roztoky, se následně pomocí robotu uvedlo do kolíky vymezeného kontaktu

se zarovnaným povrchem, při kterém se kapiláry dostaly do zákrytu s $\text{SH}(\text{CH}_2)_{11}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_6\text{OH}$ doménami. Každá z kapilár obsahovala protilátky nebo modifikované nukleové kyseliny, specifické pro sledovaný analyt, které jsou schopny kovalentně se navázat přes amidovou vazbu na reakční OH skupinu hydrofilních domén.

Příklad 3

Příprava PMAMS povrchu leptáním

Čistý zlatý povrch se vystavil působení hydrofilního alkanthiolu s OH-koncovou skupinou, $\text{SH}(\text{CH}_2)_{11}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_6\text{OH}$, (Prime a kol., Science 252:1164 až 1167) v ethanolovém roztoku (1 až 10 mM). Lineární řada tenkých, zašpičatělých leptacích nástrojů se pomocí robotů uvedla do opticky vymezeného kontaktu se zarovnaným zlatým povrchem a použila pro vyleptání X a Y rozměrů povrchu, tvořícího dvourozměrné mřížkové uspořádání $\text{SH}(\text{CH}_2)_{11}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_6\text{OH}$ domén. Podložka se následně oplachovala několik sekund (například 2 až 10 sekund) roztokem hydrofobního $\text{SH}(\text{CH}_2)_{11}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_6\text{CH}_3$ (1 až 10 mM v ethanolu). Výsledný povrch se potom mírně vysušil pod proudem dusíku. Kapilární seskupení, obsahující hydrofilní roztoky, se následně pomocí robotu uvedlo do kolíky vymezeného kontaktu se zarovnaným povrchem, při kterém se kapiláry dostaly do zákrytu s $\text{SH}(\text{CH}_2)_{11}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_6\text{OH}$ doménami. Každá z kapilár obsahovala protilátky nebo modifikované nukleové kyseliny, specifické pro sledovaný analyt, které jsou schopny kovalentně se navázat přes amidovou vazbu na reakční OH skupinu hydrofilních domén.

Příklad 4Sendvičový test na PMAMS povrchu

Výše popsaným způsobem se připravil v podstatě transparentní PMAMS povrch, na kterém byly navázány primární protilátky. Použila se transparentní podložka, elektrody a monologový povrch. PMAMS povrch se potom exponoval roztokem vzorku, u kterého se očekávalo že obsahoval sledovaný analyt. Vzorek se následně vymyl a na povrchu zůstala protilátka vážící analyty. PMAMS povrch se potom exponoval roztokem, obsahujícím sekundární ECL značené protilátky, specifické pro analyty, navázané na povrchu. Po vymytí tohoto roztoku z PMAMS povrchu zůstaly na doménách, ve kterých byl přítomen analyt, navázané ECL značené sekundární protilátky.

Svazek elektrod byl před vzájemným kontaktem se vzorkem chráněn pomocí odnímatelné bariéry, která eliminovala kontaminační účinky. Po odstranění bariéry se elektrody zvlhčily testovacím pufrem a uvedly do kontaktu s PMAMS povrchem. Svazek elektrod byl připojen k elektronickému generátoru napětových vln a napětí se aplikovalo na páry pracovní elektrody a protielektrody. CCD potom odečetl emitované světlo a získaný signál se přenesl na mikroprocesor, který převedl přijmutý signál do požadované odečitatelné formy.

Odečet se porovnal s odečtem získaným za použití kontrolních vzorků známých množství analytu, čímž se získalo aktuální množství analytu ve vzorku.

Příklad 5Test na prvním a druhém PMAMS povrchu

Výše popsaným způsobem se připravil v podstatě transparentní PMAMS povrch, na kterém byly navázány primární protilátky. PMAMS povrch se potom exponoval roztokem vzorku, u kterého se očekávalo že obsahoval sledovaný analyt. Vzorek se následně vymyl a na povrchu zůstala protilátka vážící analyty.

Druhým použitým povrchem byl PMAMS povrch, opatřený ochranným krytem se střídajícím se hydrofobním a hydrofilním vzorem, na kterém byly v určitém vzorku uspořádány mikrokapky množiny sekundárních protilátek, značené pomocí ECL zakončení.

Bariéra chránící sekundární PMAMS povrch, který byl v zákrytu s prvním PMAMS povrchem se odstranila a mikrokapky se uvedly do zákrytu s primárními protilátkami vazebných domén na prvním PMAMS povrchu. Druhý PMAMS povrch se zdvihl a první PMAMS povrch se uvedl do kontaktu se svazkem elektrod tak, že se jednotlivé elektrody ocitly v zákrytu s vazebnými doménami prvního PMAMS povrchu. Svazek elektrod se propojil s elektrickým generátorem napětových vln a napětí se aplikovalo na páry pracovní elektrody a protielektrody. Fotonka s násobičem potom odečetla emitované světlo a získaný signál se přenesl na mikroprocesor, který převedl přijmutý signál do požadované odečitatelné formy.

Odečet se porovnal s odečtem získaným za použití kontrolních vzorků známých množství analytu, čímž se získalo aktuální množství analytu ve vzorku.

Příklad 6Nukleokyselinový test na PMAMS povrchu

Výše popsaným způsobem se připravil povrch, na kterém bylo navázáno vzorované multispecifické seskupení jednořetězcových nukleokyselinových sond. Tyto sondy byly komplementární k 5' oblasti nukleové kyseliny, která představovala sledovaný analyt. PMAMS povrch se následně exponoval roztokem vzorku, u kterého se očekávalo že obsahuje sledovaný hybridizovatelný nukleokyselinový analyt, který měl být stanoven, přičemž tento vzorek se před expozicí denaturoval, tj. ošetřil tak, že se stal jednořetězcovým. Po vymytí vzorku na povrchu zůstaly hybridizované analyty. PMAMS povrch se následně exponoval roztokem obsahujícím sekundární ECL značené nukleokyselinové sondy, specifické pro 3' zakončení nukleokyselinových analytů navázaných na povrchu. Po vymytí tohoto roztoku z PMAMS povrchu zůstaly na doménách, ve kterých byl přítomen analyt, navázány ECL značené nukleokyselinové sondy.

Bariéra, chránící sekundární PMAMS povrch, který byl v zákrytu s prvním PMAMS povrchem, se odstranila a mikrokapky se uvedly do zákrytu s primárními protilátkami vazebných domén na prvním PMAMS povrchu. Druhý PMAMS povrch se zdvihl a první PMAMS povrch se uvedl do kontaktu se svazkem elektrod tak, že se jednotlivé elektrody ocitly v zákrytu s vazebnými doménami prvního PMAMS povrchu.

Svazek elektrod se propojil s elektrickým generátorem napětových vln a napětí se aplikovalo na páry pracovní

elektrody a protielektrody. CCD potom odečetl emitované světlo a získaný signál se přenesl na mikroprocesor, který převedl přijmutý signál do požadované odečitatelné formy.

Odečet se porovnal s odečtem získaným za použití kontrolních vzorků známých množství analytu, čímž se získalo aktuální množství analytu ve vzorku.

Příklad 7

Konkurenční test na PMAMS povrchu s multifotodetektorem

Výše popsaným způsobem se připravil v podstatě transparentní PMAMS povrch, na kterém byly navázány primární protilátky, specifické pro sledovaný analyt. PMAMS povrch se potom exponoval roztokem vzorku, který měl být testován a který tvořila směs vzorku, u kterého se očekávalo že obsahuje sledovaný analyt, a známého množství ECL značené molekuly, konkurující sledovanému analytu v navázání na protilátky. Vzorek se následně vymyl a na povrchu zůstala protilátka vážící analyty a/nebo značená konkurenční vazebná činidla.

Svazek elektrod byl před vzájemným kontaktem se vzorkem chráněn pomocí odnímatelné bariéry, která eliminovala kontaminační účinky. Po odstranění bariéry se elektrody zvlhčily testovacím pufrem a uvedly do kontaktu s PMAMS povrchem. Svazek elektrod byl připojen k elektronickému generátoru napětových vln a napětí se aplikovalo na páry pracovní elektrody a protielektrody. Fotonka s násobičem potom odečetla emitované světlo a získaný signál se přenesl na mikroprocesor, který převedl přijmutý signál do požadované odečitatelné formy.

Odečet se porovnal s odečtem získaným za použití kontrolních vzorků známých množství analytu, čímž se získalo aktuální množství analytu ve vzorku.

Příklad 8

Konkurenční test na PMAMS povrchu s CCD detektorem

Výše popsaným způsobem se připravil v podstatě transparentní PMAMS povrch, na kterém byly navázány primární protilátky. PMAMS povrch se potom exponoval roztokem vzorku, u kterého se očekávalo že obsahoval sledovaný analyt. Vzorek se následně vymyl a na povrchu zůstala protilátka vážící analyty.

Druhým použitým povrchem byl PMAMS povrch, opatřený ochranným krytem se střídajícím se hydrofobním a hydrofilním vzorem, na kterém byly v určitém vzorku uspořádány mikrokapky množiny známého množství ECL značené molekuly, konkurující sledovanému analytu.

Bariéra chránící sekundární PMAMS povrch, který byl v zákrytu s prvním PMAMS povrchem se odstranila a mikrokapky se uvedly do zákrytu s primárními protilátkami vazebných domén na prvním PMAMS povrchu. Druhý PMAMS povrch se zdvihl a první PMAMS povrch se uvedl do kontaktu se svazkem elektrod tak, že se jednotlivé elektrody ocitly v zákrytu s vazebnými doménami prvního PMAMS povrchu. Svazek elektrod se propojil s elektrickým generátorem napětových vln a napětí se aplikovalo na páry pracovní elektrody a protielektrody. CCD potom odečetl emitované světlo a získaný signál se přenesl na mikroprocesor, který převedl přijmutý signál do požadované odečitatelné formy.

Odečet se porovnal s odečtem získaným za použití kontrolních vzorků známých množství analytu, čímž se získalo aktuální množství analytu ve vzorku.

Příklad 9

Příprava MAB PMAMS povrchů mikroražením $\text{SH}(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_3$ alkanthiolem

Známymi postupy se připravila exponovaná a vyvolaná fotorezistentní matrice o tloušťce 1 až 2 μm se čtvercově uspořádaným vzorem. Směs SYLGARD silikonového elastomeru 184 (poly(dimethylsiloxan) od společnosti Dow Corning) a odpovídajícího SYLGARD 184 vytvrzovacího činidla (10:1) se nalila na matrici a nechala vytvrdit. Zpolymerovaný SYLGARD 184 se opatrně sejmul ze silikonové matrice. Výsledné elastomerní razítko se „smáčelo“ hydrofilním alkanthiolem s OH koncovou skupinou, $\text{SH}(\text{CH}_2)_{11}\text{OH}$, v ethanolovém roztoku (1 až 10 mM) a pomocí robotu uvedlo do kolíky vymezeného kontaktu se zarovnaným zlatým povrchem a sejmulo. Podložka se následně oplachovala několik sekund (například 2 až 10 sekund) roztokem hydrofobního alkanthiolu s methylovou koncovou skupinou, $\text{SH}(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_3$ (1 až 10 mM v ethanolu) (Kumar a kol., viz výše). Výsledný povrch se potom mírně vysušil pod proudem dusíku. Kapilární seskupení, obsahující hydrofilní roztoky, se následně pomocí robotu uvedlo do kolíky vymezeného kontaktu se zarovnaným povrchem, při kterém se kapiláry dostaly do zákrytu s $\text{SH}(\text{CH}_2)_{11}\text{OH}$ doménami a specifické protilátky se přemístily na jednotlivé domény. Každá z kapilár obsahovala monoklonální protilátky, specifické pro sledovaný analyt, které jsou schopny kovalentně se navázat

přes amidovou vazbu na reakční OH skupinu hydrofilních domén.

Příklad 10

Příprava MAB a nukleově kyselinového PMAMS povrchu mikroražením $\text{SH}(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_3$ alkanthiolem

Známými postupy se připravila exponovaná a vyvolaná fotorezistentní matrice o tloušťce 1 až 2 μm se čtvercově uspořádaným vzorem. Směs SYLGARD silikonového elastomeru 184 a odpovídajícího SYLGARD 184 vytvrzovacího činidla (10:1) se nalila na matrici a nechala vytvrdit. Zpolymerovaný SYLGARD 184 se opatrně sejmul ze silikonové matrice. Výsledné elastomerní razítko se „smáčelo“ hydrofilním alkanthiolem s OH koncovou skupinou, $\text{SH}(\text{CH}_2)_{11}\text{OH}$, v ethanolovém roztoku (1 až 10 mM) a pomocí robotu uvedlo do kolíky vymezeného kontaktu se zarovnaným zlatým povrchem a sejmulo. Podložka se následně oplachovala několik sekund (například 2 až 10 sekund) roztokem hydrofobního alkanthiolu s methylovou koncovou skupinou, $\text{SH}(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_3$ (1 až 10 mM v ethanolu) (Kumar a kol., viz výše). Výsledný povrch se potom mírně vysušil pod proudem dusíku. Kapilární seskupení, obsahující hydrofilní roztoky, se následně pomocí robotu uvedlo do kolíky vymezeného kontaktu se zarovnaným povrchem, při kterém se kapiláry dostaly do zákrytu s $\text{SH}(\text{CH}_2)_{11}\text{OH}$ doménami a specifické protilátky a/nebo hybridizované nukleové kyseliny se přemístily na jednotlivé domény. Každá z kapilár obsahovala protilátky nebo modifikované nukleové kyseliny, specifické pro sledovaný analyt, které jsou schopny kovalentně se

navázat přes amidovou vazbu na reakční OH skupinu hydrofilních domén.

Příklad 11

Příprava PMAMS povrchu za použití streptavidin-biotinového vazebného činidla

Známými postupy se připravila exponovaná a vyvolaná fotorezistentní matrice o tloušťce 1 až 2 μm se čtvercově uspořádaným vzorem. Směs SYLGARD silikonového elastomeru 184 a odpovídajícího SYLGARD 184 vytvrzovacího činidla (10:1) se nalila na matrici a nechala vytvrdit. Zpolymerovaný SYLGARD 184 se opatrně sejmul ze silikonové matrice. Výsledné elastomerní razítko se „smáčelo“ exponováním směsí merkaptoundekanolu a 12-merkapt(8-biotiamid-3,6-dioxaoktyl)dodekanamidu, která obsahovala 0,1 molární frakci biotinylátovaného thiolu (viz Spinke a kol., 1993, Langmuir 9:1821 až 5 a Spinke a kol., 1993, J. Chem. Phys. 99(9): 7012 až 9). Substrát se potom promýval několik sekund (například 2 až 10 sekund) roztokem hydrofobního alkanthiolu s CH_3 -koncovou skupinou, $\text{HS}(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_3$ alkanthiolu (1 až 10 mM v ethanolu) (viz Kumar a kol. viz výše, Biebuyck, Whitesides). Výsledný povrch se následně mírně vysušil pod proudem dusíku. Svazek kapilár, obsahující roztok strepavidinu se pomocí robotu uvedl do kolíky vymezeného kontaktu se zarovnaným povrchem. Každá kapilára ze svazku kapilár se ocitla v zákrytu a v kontaktu s biotinylátovanou doménou a po odstranění svazku kapilár se povrch promyl. Sekundární svazek kapilár, který obsahoval množinu roztoků biotinylátovaných protilátek a biotinylátovaných nukleových kyselin se uvedl do kolíky

vymezeného kontaktu se zarovnaným povrchem, při kterém se specifické protilátky a nukleové kyseliny dostaly do kontaktu s jednotlivými doménami.

Příklad 12

Příprava MAB jednoduchého povrchu

V daném oboru známými metodami (viz například Kumar a kol., viz výše) se na zlatě, na silikonovém povrchu připravil svazek elektrod, tvořený páry vzájemně do sebe zapadající elektrody a protielektrody. V tomto příkladu ležel svazek elektrod a svazek diskrétních vazebných domén na stejném povrchu podložky. Známými postupy se připravila exponovaná a vyvolaná fotorezistentní matrice o tloušťce 1 až 2 μm se vzorem, odpovídajícím uspořádání pracovních elektrod. Směs SYLGARD silikonového elastomeru 184 (poly(dimethylsiloxan) od společnosti Dow Corning) a odpovídajícího SYLGARD 184 vytvrzovacího činidla (10:1) se nalila na matrici a nechala vytvrdit. Zpolymerovaný SYLGARD 184 se opatrně sejmulo ze silikonové matrice. Výsledné elastomerní razítko se „smáčelo“ hydrofilním alkanthiolem s OH koncovou skupinou, $\text{SH}(\text{CH}_2)_{11}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_6\text{OH}$, v ethanolovém roztoku (1 až 10 mM) a pomocí robotu uvedlo do kolíky vymezeného kontaktu se zarovnanými pracovními elektrodami na zlatém povrchu a sejmulo. Kapilární seskupení, obsahující hydrofilní roztoky, se následně pomocí robotu uvedlo do kolíky vymezeného kontaktu se zarovnaným povrchem, při kterém se kapiláry dostaly do zákrytu s $\text{SH}(\text{CH}_2)_{11}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_6\text{OH}$ doménami a specifické protilátky se přemístily na jednotlivé domény. Každá z kapilár obsahovala monoklonální protilátky, specifické pro

sledovaný analyt, které jsou schopny kovalentně se navázat přes amidovou vazbu na reakční OH skupinu hydrofilních domén.

Příklad 13

Test, prováděný na MAB jednoduchém povrchu

Vyrobila se podložka, popsaná ve výše uvedeném příkladu 12. Z fotorezistentní matrice, uspořádané do vzoru kruhů, které nezávisle opisují pár pracovní elektrody a protielektrody se již popsaným způsobem vyrobilo PDMS razítko. Povrch se svazkem elektrod se exponoval vzorkem určeným pro analýzu, promyl směsí ECL značených sekundárních protilátek a následně roztokem testovacího pufru, obsahujícího tripropylamin. PDMS razítko se následně zarovnávalo, uvedlo do vymezeného kontaktu s povrchem svazku elektrod, takže kruhy PDMS razítka obklopovaly a vymezovaly jednotlivé objemové prvky testovaného pufru nad jednotlivými elektrodovými páry. Na elektrodové páry se aplikovalo přepětí, které způsobilo, že se z povrchu, vystaveného pracovní elektrodě, uvolnila monovrstva, která se navázala na ECL značené sekundární protilátky. Fotonka s násobičem potom odečetla emitované světlo a získaný signál se přenesl na mikroprocesor, který převedl přijmutý signál do požadované odečitatelné formy.

Odečet se porovnal s odečtem získaným za použití kontrolních vzorků známých množství analytu, čímž se získalo aktuální množství analytu ve vzorku.

Příklad 14Příprava jednoduchého povrchu s pracovní elektrodou a protielektrodou

V daném oboru známými metodami (viz například Kumar a kol., viz výše) se na zlatě, na silikonovém povrchu připravil svazek elektrod, tvořený páry vzájemně do sebe zapadající pracovní elektrody a zlaté protielektrody se zlatými vazebnými doménami mezi těmito vzájemně do sebe zapadajícími elektrodami. V tomto příkladu leží svazek elektrod a svazek diskrétních vazebných domén na stejném povrchu podložky. Známými postupy se připravila exponovaná a vyvolaná fotorezistentní matrice o tloušťce 1 až 2 μm se vzorem odpovídajícím vazebným doménám mezi páry vzájemně do sebe zapadajících pracovních elektrod. Směs SYLGARD silikonového elastomeru 184 (poly(dimethylsiloxan) od společnosti Dow Corning) a odpovídajícího SYLGARD 184 vytvrzovacího činidla (10:1) se nalila na matrici a nechala vytvrdit. Zpolymerovaný SYLGARD 184 se opatrně sejmulo ze silikonové matrice. Výsledné elastomerní razítko se „smáčelo“ hydrofilním alkanthiolem s OH koncovou skupinou, $\text{SH}(\text{CH}_2)_{11}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_6\text{OH}$, v ethanolovém roztoku (1 až 10 mM) a pomocí robotu uvedlo do kolíky vymezeného kontaktu se zarovnanými zlatými vazebnými doménami na povrchu, na kterém byl přítomen svazek elektrod, a sejmulo. Kapilární seskupení, obsahující hydrofilní roztoky, se následně pomocí robotu uvedlo do kolíky vymezeného kontaktu se zarovnaným povrchem, při kterém se kapiláry dostaly do zákrytu s $\text{SH}(\text{CH}_2)_{11}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_6\text{OH}$ doménami, přičemž došlo k přenesení specifických protilátek na jednotlivé domény. Každá z kapilár obsahovala monoklonální protilátky,

specifické pro sledovaný analyt, které jsou schopny kovalentně se navázat přes amidovou vazbu na reakční OH skupinu hydrofilních domén.

Příklad 15

Test, prováděný na jednoduchém povrchu s pracovní elektrodou a protielektrodou

Vyrobila se podložka, popsaná ve výše uvedeném příkladu 14. Připravený povrch se exponoval vzorkem určeným pro analýzu, promyl směsí ECL značených sekundárních protilátek a následně roztokem testovacího pufru obsahujícího tripropylamin. Svazek elektrod se připojil k elektronickému generátoru napěťových vln a na páry pracovních elektrod a protielektrod se aplikovalo napětí. Fotonka s násobičem potom odečetla emitované světlo a získaný signál se přenesl na mikroprocesor, který převedl přijmutý signál do požadované odečitatelné formy.

Odečet se porovnal s odečtem získaným za použití kontrolních vzorků známých množství analytu, čímž se získalo aktuální množství analytu ve vzorku.

Příklad 16

Příprava povrchu s protielektrodami

Znáмыми postupy se připravila exponovaná a vyvolaná fotorezistentní matrice o tloušťce 1 až 2 μm se čtvercově uspořádaným vzorem. Směs SYLGARD silikonového elastomeru

184 a odpovídajícího SYLGARD 184 vytvrzovacího činidla (10:1) se nalila na matrici a nechala vytvrdit. Zpolymerovaný SYLGARD 184 se opatrně sejmulo ze silikonové matrice. Výsledné elastomerní razítko se „smáčelo“ hydrofilním alkanthiolem s OH koncovou skupinou, $\text{SH}(\text{CH}_2)_{11}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_6\text{OH}$, v ethanolovém roztoku (1 až 10 mM) a pomocí robotu uvedlo do kolíky vymezeného kontaktu se zarovnanou, do vzoru uspořádanou protielektrodou a čtvercovou vazebnou doménou na zlatém povrchu a sejmulo. Vzorovaný zlatý povrch je tvořen adresovatelnými kruhovými protielektrodami obklopujícími vazebné domény, na které se pomocí razítka aplikoval $\text{SH}(\text{CH}_2)_{11}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_6\text{OH}$. Mezi jednotlivými zlatými protielektrodami a jednotlivými čtvercovými zlatými podklady jednotlivých monovrstev vazebných domén existují mezery, nebo-li dělicí prostory. Kapilární seskupení, obsahující roztoky vazebných reakčních činidel, se následně pomocí robotu uvedly do kolíky vymezeného kontaktu se zarovnaným povrchem, při kterém se kapiláry dostaly do zákrytu s $\text{SH}(\text{CH}_2)_{11}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_6\text{OH}$ doménami a došlo k přemístění specifických protilátek nebo nukleových kyselin na jednotlivé domény. Každá z kapilár obsahovala monoklonální protilátky nebo nukleové kyseliny, specifické pro sledovaný analyt, které jsou schopny kovalentně se navázat na reakční OH skupinu hydrofilních domén.

Příklad 17Test, prováděný na jednoduchém povrchu s pracovní elektrodou a protielektrodou na různých površích

Nosný povrch, popsáný výše v příkladu 16, se vystavil působení roztoku vzorku určeného pro analýzu. Potom se nosný povrch omyl a vystavil působení roztoku obsahujícího množinu ECL značených monoklonálních látek nebo ECL značených nukleových kyselin s různou specifičností a následně se opláchl testovacím pufrem, obsahujícím tripropylamin. Svazek transparentních adresovatelných pracovních elektrod se vyrobil tak, že každá pracovní elektroda uvedeného svazku odpovídala oblasti diskrétní vazebné domény a protielektrody na podložce, popsané výše v příkladu 16. Tyto dvě podložky se opláchly testovacím pufrem a pomocí robotu uvedly do vymezeného zarovnaného konformního kontaktu. Svazky elektrod se připojily k elektronickému generátoru napětových vln a na zarovnané páry pracovní elektrody a protielektrody se aplikovalo napětí, vytvářející mezi těmito dvěma podložkami napětové pole. CCD následně odečetl světlo emitované přes transparentní pracovní elektrodu a tento signál se přenesl na mikroprocesor, který ho převedl na požadovanou odečitatelnou formu.

Odečet se porovnal s odečtem získaným za použití kontrolních vzorků tvořených známými množstvími sledovaného analytu, čímž se vypočetlo aktuální množství analytu.

Příklad 18Výroba CC (dezintegrované) fibrilové matrice vakuovou
filtrací

Smísením 0,1 % hm./hm. CC fibril a deionizované vody se připravila vodná suspenze CC fibril, obsahující 1 mg fibril/1 ml roztoku. CC fibrily se dezintegrovaly (větší mikromilimetrové agregáty se dezintegrovaly na menší agregáty nebo jednotlivá vlákna) v suspenzi ponořením 400wattového sonifikačního zvukovodu do suspenze na dobu 10 minut až 1 hodiny. Rozsah dezintegrace se monitoroval optickým mikroskopem.

Do skleněné frity o průměru 25 mm se umístila nylonová filtrační membrána (0,47 μm velikost pórů, 25 mm průměr). Dispergovaná fibrilová suspenze se přefiltrovala přes filtr a membránu vakuovou filtrací (obr. 23A). Alikvotní podíly suspenze (5 ml) se naředily 20 ml deionizované vody a následně přefiltrovaly přes filtr a membránu. Při průměrné hustotě matrice přibližně 0,25 a 0,3 g/cm³ je zapotřebí pro 100 μm matrice 6 alikvotních podílů.

Ve vakuové filtraci se pokračovalo až do odstranění veškeré vody z matrice (stanoveno vizuální kontrolou). Matrice se odtrhla (manuálně) přímo z filtrační membrány.

Matrice se sušila v peci přibližně 10 až 15 minut při 60°C. Matrice se nařezala, vyřízla pomocí průbojníku nebo se jiným způsobem separovala na menší části pro další použití.

Příklad 19Výroba fibrilové matrice na nosném kovovém sítu odpařováním

Smísením 0,1% hm./hm. CC fibril a deionizované vody se připravila vodná suspenze CC fibril, obsahující 1 mg fibril/1 ml roztoku. CC fibrily se dezintegrovaly (větší mikromilimetrové agregáty se dezintegrovaly na menší agregáty nebo jednotlivá vlákna) v suspenzi ponořením 400wattového sonifikačního zvukovodu do suspenze na dobu 10 minut až 1 hodiny. Rozsah dezintegrace se monitoroval optickým mikroskopem.

Čtvercové síto z nerezavějící oceli o ploše 1 cm² (400) se umístilo na papírový filtr o průměru 25 mm. Na povrch sestavy, tvořené sítem a filtračním papírem, se odpipetoval 5ml alikvotní podíl suspenze. Voda v suspenzi se nechala odpařit buď při pokojové teplotě a tlaku nebo ve vyhřáté peci.

Po vysušení fibrilové matrice se přidaly další alikvotní podíly. Fibrily a síto se odtrhly jako celistvý celek z filtračního papíru.

Matrice se nařezala, vyřízla pomocí průbojníku nebo se jiným způsobem rozdělila na další části, určené pro další použití.

Příklad 20.Imobilizace avidinu na fibrilách, nesoucích NHS-esterové funkční skupiny

Fibrily, modifikované pomocí COOH (poskytnuté společností Hyperion Catalysts Inc.), se suspendovaly za stálého míchání v bezvodém dioxanu při koncentraci přibližně 10 mg/ml. Potom se přidal dvacetinásobný molární přebytek N-hydroxysukcinimidu, který se nechal rozpustit. Následně se přidal dvacetinásobný molární přebytek ethyldiaminopropylkarbodiimidu (EDAC) a směs se míchala další dvě hodiny při pokojové teplotě.

Po ukončení míchání se supernatant odsál a pevné látky se třikrát promyly bezvodým dioxanem a jednou bezvodým methanolem a přefiltrovaly se přes 0,45 μ m polysulfonovou membránu. Filtrát se promyl dalším methanolem a přemístil do skleněné lahvičky, kde se za vakua zbavil rozpouštědla.

10,4 mg fibril s NHS-esterovými funkčními skupinami se promylo PBS-1 (přibližně 70 mM fosfát, 150 mM NaCl) (reakční činidlo ORIGEN 402-130-01, pH 7,8, IGEN, Inc.). Promyté fibrily se suspendovaly ve 2,3 ml roztoku avidinu (8,3 mg avidinu/ml PBS-1).

Suspenze se nechala 1,5 hodiny odstát při pokojové teplotě za konstantního otáčení baňky, které vyvolávalo míchání.

Po uplynutí 1,5 hodiny se suspenze skladovala dalších 16 hodin při 4°C, potom se ohřála na pokojovou teplotu a promyla PBS-1 a skladovala se při 4°C jako suspenze v PBS-1.

Příklad 21Imobilizace monoklonální látky (anti-AFP) na uhlíkových fibrilách

Uhlíkové fibrily modifikované NHS-estry se připravily způsobem popsaným v příkladu 20.

14 mg fibril modifikovaných NHS-estery se smísilo s 500 ml PBS-1 pufru. Směs po dvacetiminutové sonifikaci přešla na viskózní suspenzi. Do této suspenze se přidalo dalších 500 ml pufru PBS-1.

Do výše popsané suspenze se přidalo celkem 1,6 mg anti-AFP (alfa-fetální proteinové) protilátky v 80ml pufru PBS-1. Reakční směs se nechala 2,5 hodiny odstát při pokojové teplotě.

Do takto odstáté směsi se přidalo 6 ml pufru PBS-1 a reakční směs se odstřeďovala 5 minut při 4°C. Po odstředění se supernatant odstranil pomocí pipety. Tento postup se zopakovat devětkrát.

Po posledním propláchnutí se odstranil supernatant a antiAFP-fibrilový produkt se skladoval při 4°C.

Příklad 22Cyklické voltamogramy fibrilových matric: srovnání fibrilové matrice se zlatou fóliovou elektrodou

Změřily se cyklické voltamogramy 6 mM $\text{Fe}^{3+/2+}(\text{CN})_6$ v 0,5 M K_2SO_4 . Obrázek 30A ukazuje cyklický voltamogram pro nemodifikovanou fibrilovou maticí CC (dispergovaných)

fibril, měřený při 0,10 mA/cm a při 10, 25 a 50 mV/s. Matrice se vyrobila způsobem popsaným v příkladu 18. Obrázek 30B znázorňuje cyklický voltamogram zlaté fóliové elektrody, měřený při 0,05 mA/cm a při 10, 25 a 50 mV/s. Všechny potenciály jsou ve voltech vs. Ag/AgCl.

Příklad 23

Elektrochemické vlastnosti elektrod tvořených fibrilovou maticí: srovnání anodového maximálního proudu s tloušťkou matrice

Měřily se cyklické voltamogramy 6 mM $\text{Fe}^{3+/2+}(\text{CN})_6$ v 0,5 M K_2SO_4 pro fibrilové matrice stejné plochy (0,20 cm²), ale různé tloušťky. Z obrázku 31 vyplývá, že anodový maximální proud se zvyšoval s rostoucí tloušťkou matrice v případě tlouštěk, pohybujících se v rozmezí od 24 μm do 425 μm. Při jednotlivých tloušťkách se maximální anodový proud rovněž zvyšoval s rychlostí scanování (platí pro rychlosti, pohybující se od 10 mV/s do 150 mV/s). Rychlost růstu anodového maximálního píku jako funkce tloušťky se rovněž zvyšovala s rostoucí tloušťkou. Fibrilové matrice s tloušťkou 24 μm se chovaly srovnatelně se zlatými fóliovými elektrodami.

Příklad 24

Nespecifická vaznost proteinů na fibrily

Nespecifická vaznost proteinů na uhlíkové fibrily (CC) se měřila následujícím způsobem: i) roztok proteinů

značených pomocí $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}$ („TAG1“) se vystavoval působení známého množství uhlíkových fibril až do dosažení rovnovážného stavu; ii) roztok značených proteinů a fibril se odstřeďoval a po odstřeďování se izoloval supernatant; a iii) množství značeného proteinu, který zůstal v supernatantu se stanovil za použití elektrochemiluminescence (ECL).

Pro sestavení křivky znázorněné na obrázku 32 se 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ protilátky anti-CEA navázané na modifikovaný TAG1 (protilátky karcinoembryonového antigenu navázaného na modifikované TAG1 ECL značení) přidaly do postupných zředění CC (nemodifikovaných) fibril v 0,1 M fosfátodraselném pufru při pH 7. Po dvacetiminutovém víření se fibrily odstranily odstřeďováním. ECL testy, které měřily množství proteinu (nenavázaného, který zůstal v supernatantu), se prováděly v analyzáru ORIGEN 1.5 (IGEN, Inc.) na alikvotních podílech supernatantu reakční směsi, pětkrát naředěného testovacím pufrům ORIGEN. Snížení ECL signálu v porovnání s ECL signálem reakční směsi, která nebyla vystavena působení fibril, bylo důsledkem zvýšení vazebnosti proteinu, označeného pomocí modifikovaného TAG1 v případě, že byla přítomna vyšší koncentrace uhlíkových fibril.

Příklad 25

Redukce nespecifické vazebnosti proteinů na fibrily pomocí detergentů a povrchově aktivních činidel

Za použití metody popsané v příkladu 24 se analyzoval vliv povrchově aktivního činidla na vazebnost proteinu na

fibrilu. Do směsi fibril a modifikovaného TAG1, na které byla navázána protilátka anti-CEA, se přidal Triton X-100 a roztok se 20 minut inkuboval. Po ukončení inkubace se zkumavky odstředily a alikvotní podíly supernatantu, které se pětikrát naředily testovacím pufrem ORIGEN, se analyzovaly pomocí ECL. Získané výsledky jsou shrnuty v níže uvedené tabulce a na obrázku 33.

Zkumavka číslo	[T-X100], ppm	Maximální intenzita	Prot-TAG1 μg/ml	[GF], ppm
19	1674	1611	2,65	52
18	837	1634	2,65	52
17	418	1697	2,65	52
16	209	1583	2,65	52
15	105	1772	2,65	52
14	52	1463	2,65	52
13	26	627	2,65	52
12	13	23	2,65	52

Křivka, která se získala vynesemím ECL intenzity proteinu značeného modifikovaným TAG1 v roztoku proti koncentraci Tritonu X-100, je znázorněna na obrázku 33. Vyšší ECL signál odpovídal většímu množství proteinu značeného modifikovaným TAG1 v supernatantu, což odpovídalo menšímu množství proteinu značeného pomocí modifikovaného TAG1, navázanému na fibrily. Koncentrace Tritonu X-100, které se pohybovaly od 10 ppm do 100 ppm redukovaly vaznost proteinu; zvyšující se koncentrace od 100 ppm do 2000 ppm již neměly žádný další vliv na redukci rozsahu vazebnosti.

Příklad 26ECL volné TAG v roztoku s elektrodou tvořenou fibrilovou maticí

Na montážní plochu 3403 držáku 3401 „fibrilového článku“ upínacího prvku pracovní elektrody, znázorněnou na obrázku 34, se instalovala fibrilová matrice, připravená v příkladu 18. Držák 3401 se zasunul na dno komory 3400 elektrochemického článku. Do této komory elektrochemického článku se otvorem 3402 referenčního článku se instalovala 3M Ag/AgCl referenční elektroda (Cyprus č. EE008). Článek se naplnil testovacím pufrem (IGEN č. 402-005-01 lot#5298) a přichytil k PMT držáku 3404 za použití univerzálního programátoru EG&G PARC, modelu 175, potenciostatu a galvanostatu EG&G, modelu 175, se napětí rozložilo od 0 V do +3 V vs. Ag/AgCl při 100 mV/s. ECL se měřila pomocí Hamamatsu R5600U-01, kterému dodával energii fotometr Pacific Instruments, model 126, při 900 V. Analogová data se digitalizovala při 10 Hz pomocí CIO-DAS-1601 A/D panelu, poháněného HEM Snap-Master. Fibrilový článek se vysušil, vypláchl 1 000 pM TAG1 (IGEN č. 402-004-C lot#4297) a naplnil 1 000 pM TAG1. Potenciál se rozdělil jako v případě testovacího pufru. Obrázek 35 znázorňuje ECL stopy (měřeno při $24,0 \pm 0,2^\circ\text{C}$) pro testovací pufr 3501 a pro 1 000 pM TAG1 3502. Tmavá plocha maximální ECL byla 22,10 nAs pro testovací pufr a 46,40 nAs pro 1 000 pM TAG1.

Příklad 27ECL adsorbované značené protilátky s elektrodou tvořenou fibrilovou maticí

Z nemodifikovaných CC dispergovaných fibril se způsobem popsaným v příkladu 18 vyrobily fibrilové matrice o tloušťce $8,89 \times 10^{-4}$ mm. Ze suchých matric se následně pomocí raznice vyřízly třímilimetrové kotouče, které se namontovaly na podložky. Podložky, použité v tomto experimentu, se vyrobily z $7,62 \times 10^{-3}$ mm polyesterové fólie, potištěné přes síto vodivou zlatou barvou. Tato vodivá zlatá barva tvořila protielektrodu, referenční elektrodu a vedení pro pracovní a další elektrody. Dva kotouče fibrilové matrice se namontovaly na každou vzorovanou podložku za použití oboustranné vodivé pásky, obsahující uhlík (Adhesives Research). Po namontování se kotouče zašpinily $0,5 \mu\text{l}$ $10 \mu\text{g/ml}$ anti-TSH protilátky, navázané na modifikovaném TAG1 v deionizované vodě (Ru-TSH mono 1:2 26JUN95, IGEN, Inc.) nebo $0,5 \mu\text{l}$ $10 \mu\text{g/ml}$ anti-TSH protilátky v deionizované vodě (TSH poly 25JUN95, IGEN, Inc.) a nechaly vysušit. Po vysušení se matrice smáčely testovacím pufrem IGEN. Matrice, napuštěné pufrem na podložce, se zavedly do měřicího přístroje IGEN Origen 1.5 a ECL se odečetla při scanovací rychlosti 500 mV/s a napětí 0 až 4 500 mV. Obrázek 43 srovnává maximální ECL signály pro maticí 4301, obsahující TAG1 protilátku, a maticí 4302, obsahující protilátku.

Příklad 28Elektroda na bázi fibrilové matrice, využívající ECL pro sendvičový test

Anti-AFP protilátka se imobilizovala na fibrilách výše popsaným způsobem. Anti-AFP fibrily se promyly v deionizované vodě (dI) a resuspendovaly při hustotě 1 mg/ml. Čtyřvrstvá fibrilová matrice se připravila pomocí vakuové filtrace způsobem, popsaným v příkladu 18. 2 mg anti-AFP fibril se přidaly do 3 mg plochých CC dispergovaných fibril a směs se naředila do celkového objemu 20 ml deionizovanou vodou. Naředěná směs se přefiltrovala přes 0,45 μ m nylonový filtr. Tato základní matricová vrstva byla následně doplněna dvěma vrstvami, tvořícími jádro, z nichž každá obsahovala 5 mg rovinných CC dispergovaných fibril. Na tyto matrice se konečně přidala směsová fibrilová vrstva, totožná s první vrstvou. Tímto způsobem se připravila fibrilová matrice, v jejímž horním a spodním povrchu se nacházelo přibližně 40% anti-AFP fibril a jejíž jádro tvořily v podstatě stoprocentně nemodifikované fibrily. Tato matrice se sušila vzduchem za vakua. Pomocí raznice byly vyříznuty třímilimetrové kotouče, které se následně upevnily na podložky způsobem popsaným v příkladu 27. Suché podložené anti-AFP matrice se napustily AFP kalibrátory A, C a F (IGEN, Inc.) a nechaly se inkubovat 15 minut při pokojové teplotě na lavici. Po inkubaci se podložené elektrody promývaly 10 minut deionizovanou vodou a potom vysušily pomocí utěrky bez chlupu. Fibrilové matrice se potom napustily anti-AFP navázaným na protilátku značenou modifikovaným TAG1 (IGEN, Inc.) a nechaly se inkubovat dalších 15 minut na lavici při

pokožkové teplotě. Po inkubaci se podložené elektrody promyly deionizovanou vodou a vysušily pomocí utěrky. Fibrilové matrice se následně napustily testovacím pufrem IGEN a odečetly způsobem popsáním v příkladu 27.

Příklad 29

ECL detekce avidinu, značeného pomocí TAG1 na polyakrylamidovém povrchu

Zesítovaný polyakrylamidový gel, obsahující kovalentně navázaný biotin se připravil kopolymerací akrylamidu, bisakrylamidu a N-akryloyl-N'-biotinyl-3,6-dioxaoktan-1,9-diaminu (biotin navázaný na akrylamidový zbytek přes tri(ethylenglykolové) vazebné činidlo) za použití známých podmínek (iniciace persíranem amonným a TEMED). V tomto experimentu se použily následující koncentrace tří monomerních druhů: 2,6 M, 0,065 M, resp. 0,23 M (tyto koncentrace akrylamidu a bisakrylamidu poskytly gely s póry, jejichž velikost byla menší než většina proteinů). Polymerace roztoku obsahujícího monomer mezi dvěma skleněnými deskami, vzájemně od sebe odsazenými o přibližně 0,7 mm, poskytla gelovou desku o stejné tloušťce. Po ukončení polymerační reakce se veškerý nezabudovaný biotin vymyl smáčením gelu ve čtyřech dávkách PBS. Avidin značený pomocí modifikovaného TAG1 (kde avidin označuje NeutrAvidin, modifikovaný avidin, který vykazuje redukovaný NSB) se navázal na povrch gelu dvacetiminutovým máčením gelu v roztoku, obsahujícím protein při koncentraci 50 µg/ml. Přebytný avidin, značený pomocí TAG1, se následně vymyl máčením gelu ve čtyřech dávkách ECL testovacího pufru (200 mM fosforečnan sodný, 100 mM

tripropylamin, 0,02% (hm./obj.) Tween-20, pH 7,2). Jak ukazuje obrázek 39, gel 3900 se následně uvedl do kontaktu se zlatou pracovní elektrodou 3901 a protielektrodou 3902, uspořádaných do vzoru na skleněné podložce 3903. Napětový spád mezi těmito dvěma elektrodami z 0,0 na 3,0 V a zpět na 0,0 V rychlostí 500 mV/s způsobil ECL světelný signál, který se měřil v PMT 3904, umístěným nad gelem (obr. 40). Gel, připravený bez zabudování biotinu, obsahující akrylamidový derivát neposkytl žádný ECL signál (obr. 41). Tento signál, získaný pro polymer obsahující biotin, svědčil o blízkosti plné monovrstvy proteinu, která se nacházela na povrchu gelu.

Příklad 30

ECL sendvičový imunologický test na polyakrylamidovém povrchu

Způsobem popsaným v příkladu 29 se připravil zesíťovaný polyakrylamidový gel, obsahující kovalentně navázaný biotin. Na povrch gelu se adsorboval streptavidin, který vytvořil vazebnou doménu schopnou zachytit druhy vážící biotin. Povrch se ošetřil roztokem, obsahujícím tripropylamin, neznámou koncentraci analytu, protilátku analytu značenou biotinem a odlišnou protilátku analytu značenou ECL TAG1. Přítomnost analytu způsobila tvorbu komplexu analytu a dvou protilátek, které se následně zachytily na streptavidinovém povrchu. ECL TAG1 navázané na sekundární protilátce, která se nacházela na povrchu, se měřilo způsobem popsaným v příkladu 29.

Příklad 31Vícečetné ECL sendvičové imunologické testy na polyakrylamidových površích, nanesených na elektrodě

Známými postupy se připravila exponovaná a vyvolaná fotorezistentní matrice o tloušťce 1 až 2 μm , která poskytla vzor kruhových vlisů, uspořádaných v řadě. Směs SYLGARD silikonového elastomeru 184 a odpovídajícího SYLGARD 184 vytvrzovacího činidla (10:1) se nalila na matrici a nechala vytvrdit. Zpolymerovaný SYLGARD 184 se opatrně sejmul ze silikonové matrice. Výsledné elastomerní razítko se „smáčelo“ roztokem obsahujícím OH-zakončený thiol, $\text{HS}-(\text{CH}_2)_{11}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_3\text{OH}$, (1 až 10 mM) v ethanolu a uvedlo do kontaktu se zarovnaným zlatým povrchem a sejmulo. Substrát se promýval několik sekund roztokem obsahujícím thiol, $\text{HS}-(\text{CH}_2)_{10}-\text{CH}_3$, (1 až 10 mM v ethanolu). Výsledný povrch se následně opláchl ethanolem a vysušil pod proudem dusíku. Ošetření povrchu roztokem, obsahujícím akryloylchlorid a triethylamin v dioxanu, způsobilo funkcionalizaci hydroxylem zakončených domén akrylátovými skupinami. Svazek kapilár, obsahující směsi akrylamidu, bisakrylamidu, N-akryoylsukcinimidu, kyseliny azobis-kyanovalekové a protilátek, obsahujících aminoskupiny, se následně uvedl do kontaktu se zarovnaným povrchem, při kterém se kapiláry ocitly v zákrytu s akrylátem zakončenými doménami a došlo k přemístění předpolymeračních roztoků, obsahujících specifické protilátky, na jednotlivé domény. Každá z kapilár kapilárního svazku obsahovala protilátky, specifické pro jiný sledovaný analyt. Expozice kapek předpolymeru, rozmístěných na jednotlivých doménách UV světlem, vedla ke tvorbě zesíťovaných gelů na podkladu na

jednotlivých vazebných doménách povrchu. Test se prováděl tak, že se substrát ošetřil směsí analytů, které byly schopny se navázat na jednu nebo více vazebných domén, nacházejících se na gelových površích v pufrovaném roztoku, obsahujícím tripropylamin a sekundární protilátky, značené pomocí ECL TAG1. Vazebné domény 4200, 4201 a 4202 na polyakrylamidových kapkách 4203 na zlaté elektrodě 4232 se následně umístily do těsné blízkosti ITO pracovní elektrody 4204, jak ukazují obrázky 42A až B. Světlo, emitované z jednotlivých vazebných domén, se kvantifikovalo pomocí CCD kamery 4205 a porovnávalo s výsledky získanými pro vazebné domény vnitřních standardů, obsažených v roztoku vzorku.

Příklad 32

Mnohočetné ECL konkurenční imunologické testy na polyakrylamidových površích, nanesených na elektrodě

Známymi postupy se připravila exponovaná a vyvolaná fotorezistentní matrice o tloušťce 1 až 2 μm , která poskytla vzor kruhových vlisů, uspořádaných v řadě. Směs SYLGARD silikonového elastomeru 184 a odpovídajícího SYLGARD 184 vytvrzovacího činidla (10:1) se nalila na matrici a nechala vytvrdit. Zpolymerovaný SYLGARD 184 se opatrně sejmulo ze silikonové matrice. Výsledné elastomerní razítko se „smáčelo“ roztokem, obsahujícím OH-zakončený thiol, $\text{HS}-(\text{CH}_2)_{11}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_3-\text{OH}$, (1 až 10 mM) v ethanolu a uvedlo do kontaktu se zarovnaným zlatým povrchem a sejmulo. Substrát se promýval několik sekund roztokem obsahujícím thiol, $\text{HS}-(\text{CH}_2)_{10}-\text{CH}_3$, (1 až 10 mM v ethanolu). Výsledný povrch se následně opláchl ethanolem a vysušil pod proudem dusíku. Ošetření povrchu roztokem, obsahujícím

akryloylchlorid a triethylamin v dioxanu, způsobilo funkcionalizaci hydroxyem zakončených domén akrylátovými skupinami. Svazek kapilár, obsahující směsi akrylamidu, bisakrylamidu, N-akryoylsukcinimidu, kyseliny azobis-kyanovalekové a protilátek, se následně uvedl do kontaktu se zarovnaným povrchem, při kterém se kapiláry ocitly v zákrytu s akrylátem zakončenými doménami a došlo k přemístění předpolymeračních roztoků, obsahujících specifické protilátky, na jednotlivé domény. Každá z kapilár kapilárního svazku obsahovala protilátky, specifické pro jiný sledovaný analyt. Expozice kapek předpolymeru, rozmístěných na jednotlivých doménách UV světlem, vedla ke tvorbě zesítovaných gelů na podkladu, na jednotlivých vazebných doménách povrchu. Test se prováděl tak, že se substrát ošetřil směsí analytů, které byly schopny se navázat na jednu nebo více vazebných domén, nacházejících se na gelových površích v pufrovaném roztoku, obsahujícím tripropylamin a analogy analytů, značených pomocí ECL TAG1 (tj. konkurenty ECL TAG1 značených a neznačených analytů při navazování na vazebné domény). Vazebné domény 4200, 4201 a 4202 na polyakrylamidových kapkách 4203 na zlaté elektrodě 4232 se následně umístily do těsné blízkosti ITO pracovní elektrody 4204, jak ukazuje obrázek 42. Světlo, emitované z jednotlivých vazebných domén, se kvantifikovalo pomocí CCD kamery 4205 a porovnávalo s výsledky získanými pro vazebné domény vnitřních standardů, obsažených v roztoku vzorku.

Příklad 33Vícečetné ECL testy vaznosti buněk na polyakrylamidové
povrchy, nanesené na elektrodě

Známými postupy se připravila exponovaná a vyvolaná fotorezistentní matrice o tloušťce 1 až 2 μm , která poskytla vzor kruhových vlisů, uspořádaných v řadě. Směs SYLGARD silikonového elastomeru 184 a odpovídajícího SYLGARD 184 vytvrzovacího činidla (10:1) se nalila na matrici a nechala vytvrdit. Zpolymerovaný SYLGARD 184 se opatrně sejmul ze silikonové matrice. Výsledné elastomerní razítko se „smáčelo“ roztokem, obsahujícím OH-zakončený thiol, $\text{HS}-(\text{CH}_2)_{11}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_3-\text{OH}$, (1 až 10 mM) v ethanolu a uvedlo do kontaktu se zarovnaným zlatým povrchem a sejmulo. Substrát se promýval několik sekund roztokem obsahujícím thiol, $\text{HS}-(\text{CH}_2)_{10}-\text{CH}_3$, (1 až 10 mM v ethanolu). Výsledný povrch se následně opláchl ethanolem a vysušil pod proudem dusíku. Ošetření povrchu roztokem, obsahujícím akryloylchlorid a triethylamin v dioxanu, způsobilo funkcionalizaci hydroxylem zakončených domén akrylátovými skupinami. Svazek kapilár, obsahující směsi akrylamidu, bisakrylamidu, N-akryoylsukcinimidu, kyseliny azobis-kyanovalerové a protilátek směřovaných proti povrchům buněk, se následně uvedl do kontaktu se zarovnaným povrchem, při kterém se kapiláry ocitly v zákrytu s akrylátem zakončenými doménami a došlo k přemístění předpolymeračních roztoků, obsahujících specifické protilátky, na jednotlivé domény. Expozice kapek předpolymeru, rozmístěných na jednotlivých doménách UV světlem, vedla ke tvorbě zesíťovaných gelů na podkladu na jednotlivých vazebných doménách povrchu. Test se prováděl

tak, že se vazebné domény ošetřily nejprve suspenzí buněk a následně směsí vazebných reakčních činidel schopných vázat jednu nebo více buněk navázaných na gelové povrchy v pufrovaném roztoku, obsahujícím tripropylamin a sekundární protilátky, značené pomocí ECL TAG1 a/nebo další vazebná činidla, specifická pro uvedené analyty. Vazebné domény 4200, 4201 a 4202 na polyakrylamidových kapkách 4203 na zlaté elektrodě 4232 se následně umístily do těsné blízkosti ITO pracovní elektrody 4204, jak ukazuje obrázek 42. Světlo, emitované z jednotlivých vazebných domén, se kvantifikovalo pomocí CCD kamery 4205 a porovnávalo s výsledky získanými pro vazebné domény vnitřních standardů, obsažených v roztoku vzorku.

Příklad 34

Vícečetné ECL testy vaznosti analytů na buňky polyakrylamidové povrchy, nanesené na elektrodě

Známými postupy se připravila exponovaná a vyvolaná fotorezistentní matrice o tloušťce 1 až 2 μm , která poskytla vzor kruhových vlisů, uspořádaných v řadě. Směs SYLGARD silikonového elastomeru 184 a odpovídajícího SYLGARD 184 vytvrzovacího činidla (10:1) se nalila na matrici a nechala vytvrdit. Zpolymerovaný SYLGARD 184 se opatrně sejmulo ze silikonové matrice. Výsledné elastomerní razítko se „smáčelo“ roztokem, obsahujícím OH-zakončený thiol, $\text{HS}-(\text{CH}_2)_{11}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_3-\text{OH}$, (1 až 10 mM) v ethanolu a uvedlo do kontaktu se zarovnaným zlatým povrchem a sejmulo. Substrát se promýval několik sekund roztokem obsahujícím thiol, $\text{HS}-(\text{CH}_2)_{10}-\text{CH}_3$, (1 až 10 mM v ethanolu). Výsledný povrch se následně opláchl ethanollem a vysušil pod proudem

dusíku. Ošetření povrchu roztokem, obsahujícím akryloylchlorid a triethylamin v dioxanu, způsobilo funkcionalizaci hydroxytem zakončených domén akrylátovými skupinami. Svazek kapilár, obsahující směsi akrylamidu, bisakrylamidu, N-akryoylsukcinimidu, kyseliny azobis-kyanovalerové a buněk, se následně uvedl do kontaktu se zarovnaným povrchem, při kterém se kapiláry ocitly v zákrytu s akrylátem zakončenými doménami a došlo k přemístění předpolymeračních roztoků, obsahujících specifické typy buněk, na jednotlivé domény. Každá z kapilár kapilárního svazku obsahovala protilátky, specifické pro jiný sledovaný analyt. Expozice kapek předpolymeru, rozmístěných na jednotlivých doménách UV světlem, vedla ke tvorbě zesíťovaných gelů na podkladu na jednotlivých vazebných doménách povrchu. Test se prováděl tak, že se gely ošetřily vzorkem obsahujícím směs analytů, schopných vázat se na jednu nebo více vazebných domén, které se nacházely na gelových površích v pufrovaném roztoku, obsahujícím tripropylamin a sekundární protilátky, značené pomocí ECL TAG1 a/nebo další vazebná činidla, specifická pro uvedené analyty. Vazebné domény 4200, 4201 a 4202 na polyakrylamidových kapkách 4203 na zlaté elektrodě 4232 se následně umístily do těsné blízkosti ITO pracovní elektrody 4204, jak ukazuje obrázek 42. Světlo, emitované z jednotlivých vazebných domén, se kvantifikovalo pomocí CCD kamery 4205 a porovnávalo s výsledky získanými pro vazebné domény vnitřních standardů, obsažených v roztoku vzorku.

Příklad 35Násobné ECL konkurenční hybridizační testy na polyakrylamidových površích, nanesených na elektrodě

Známými postupy se připravila exponovaná a vyvolaná fotorezistentní matrice o tloušťce 1 až 2 μm , která poskytla vzor kruhových vlisů, uspořádaných v řadě. Směs SYLGARD silikonového elastomeru 184 a odpovídajícího SYLGARD 184 vytvrzovacího činidla (10:1) se nalila na matrici a nechala vytvrdit. Zpolymerovaný SYLGARD 184 se opatrně sejmul ze silikonové matrice. Výsledné elastomerní razítko se „smáčelo“ roztokem, obsahujícím OH-zakončený thiol, $\text{HS}-(\text{CH}_2)_{11}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_3-\text{OH}$, (1 až 10 mM) v ethanolu a uvedlo do kontaktu se zarovnaným zlatým povrchem a sejmulo. Substrát se promýval několik sekund roztokem obsahujícím thiol, $\text{HS}-(\text{CH}_2)_{10}-\text{CH}_3$, (1 až 10 mM v ethanolu). Výsledný povrch se následně opláchl ethanolem a vysušil pod proudem dusíku. Ošetření povrchu roztokem, obsahujícím akryloylchlorid a triethylamin v dioxanu, způsobilo funkcionalizaci hydroxylem zakončených domén akrylátovými skupinami. Svazek kapilár, obsahující směsi akrylamidu, bisakrylamidu, N-akryoylsukcinimidu, kyseliny azobis-kyanovalekové a nukleokyselinových sond modifikovaných aminokyselinami, se následně uvedl do kontaktu se zarovnaným povrchem, při kterém se kapiláry ocitly v zákrytu s akrylátem zakončenými doménami a došlo k přemístění předpolymeračních roztoků, obsahujících specifické sondy, na jednotlivé domény. Každá z kapilár kapilárního svazku obsahovala sondy, specifické pro sledovanou nukleokyselinovou sekvenci. Expozice kapek předpolymeru, rozmístěných na jednotlivých doménách UV

světlem, vedla ke tvorbě zesítovaných gelů na podkladu, na jednotlivých vazebných doménách povrchu. Test se prováděl tak, že se substrát ošetřil směsí vzorku, která by mohla obsahovat sekvence, schopné navázat se na jednu nebo více vazebných domén, které se nacházejí na gelových površích v pufrovaném roztoku, obsahujícím tripropylamin a sekvence, značené pomocí ECL TAG1, které konkurují sledovaným analytům v navázání na povrch. Vazebné domény 4200, 4201 a 4202 na polyakrylamidových kapkách 4203 na zlaté elektrodě 4232 se následně umístily do těsné blízkosti ITO pracovní elektrody 4204, jak ukazuje obrázek 42. Světlo, emitované z jednotlivých vazebných domén, se kvantifikovalo pomocí CCD kamery 4205 a porovnávalo s výsledky získanými pro vazebné domény vnitřních standardů, obsažených v roztoku vzorku.

Příklad 36

Vícečetné ECL hybridizační sendvičové testy na polyakrylamidových površích, nanesených na elektrodě

Známymi postupy se připravila exponovaná a vyvolaná fotorezistentní matrice o tloušťce 1 až 2 μm , která poskytla vzor kruhových vlisů, uspořádaných v řadě. Směs SYLGARD silikonového elastomeru 184 a odpovídajícího SYLGARD 184 vytvrzovacího činidla (10:1) se nalila na matrici a nechala vytvrdit. Zpolymerovaný SYLGARD 184 se opatrně sejmul ze silikonové matrice. Výsledné elastomerní razítko se „smáčelo“ roztokem, obsahujícím OH-zakončený thiol, $\text{HS}-(\text{CH}_2)_{11}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_3-\text{OH}$, (1 až 10 mM) v ethanolu a uvedlo do kontaktu se zarovnaným zlatým povrchem a sejmulo. Substrát se promýval několik sekund roztokem obsahujícím thiol, $\text{HS}-(\text{CH}_2)_{10}-\text{CH}_3$, (1 až 10 mM v ethanolu). Výsledný

povrch se následně opláchl ethanolem a vysušil pod proudem dusíku. Ošetření povrchu roztokem, obsahujícím akryloylchlorid a triethylamin v dioxanu, způsobilo funkcionalizaci hydroxyem zakončených domén akrylátovými skupinami. Svazek kapilár, obsahující směsi akrylamidu, bisakrylamidu, N-akryoylsukcinimidu, kyseliny azobis-kyanovalerové a nukleokyselinových sond modifikovaných aminokyselinami, se následně uvedl do kontaktu se zarovnaným povrchem, při kterém se kapiláry ocitly v zákrytu s akrylátem zakončenými doménami a došlo k přemístění předpolymeračních roztoků, obsahujících specifické sondy, na jednotlivé domény. Každá z kapilár kapilárního svazku obsahovala sondy, specifické pro sledovanou nukleokyselinovou sekvenci. Expozice kapek předpolymeru, rozmístěných na jednotlivých doménách UV světlem, vedla ke tvorbě zesítovaných gelů na podkladu, na jednotlivých vazebných doménách povrchu. Test se prováděl tak, že se substrát ošetřil směsí vzorku, která by mohla obsahovat sekvence, schopné navázat se na jednu nebo více vazebných domén, které se nacházejí na gelových površích v pufrovaném roztoku, obsahujícím tripropylamin a sekvence, značené pomocí ECL TAG1, které se mohou vázat na analyty v sekvencích nekomplementárních se sondami, navázanými na povrch. Vazebné domény 4200, 4201 a 4202 na polyakrylamidových kapkách 4203 na zlaté elektrodě 4232 se následně umístily do těsné blízkosti ITO pracovní elektrody 4204, jak ukazuje obrázek 42. Světlo, emitované z jednotlivých vazebných domén, se kvantifikovalo pomocí CCD kamery 4205 a porovnávalo s výsledky získanými pro vazebné domény vnitřních standardů, obsažených v roztoku vzorku.

Příklad 37Vícečetné testy různých typů na polyakrylamidových površích nanesených na elektrodě

Známými postupy se připravila exponovaná a vyvolaná fotorezistentní matrice o tloušťce 1 až 2 μm , která poskytla vzor kruhových vlisů, uspořádaných v řadě. Směs SYLGARD silikonového elastomeru 184 a odpovídajícího SYLGARD 184 vytvrzovacího činidla (10:1) se nalila na matrici a nechala vytvrdit. Zpolymerovaný SYLGARD 184 se opatrně sejmul ze silikonové matrice. Výsledné elastomerní razítko se „smáčelo“ roztokem, obsahujícím OH-zakončený thiol, $\text{HS}-(\text{CH}_2)_{11}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_3-\text{OH}$, (1 až 10 mM) v ethanolu a uvedlo do kontaktu se zarovnaným zlatým povrchem a sejmulo. Substrát se promýval několik sekund roztokem obsahujícím thiol, $\text{HS}-(\text{CH}_2)_{10}-\text{CH}_3$, (1 až 10 mM v ethanolu). Výsledný povrch se následně opláchl ethanolem a vysušil pod proudem dusíku. Ošetření povrchu roztokem, obsahujícím akryloylchlorid a triethylamin v dioxanu, způsobilo funkcionalizaci hydroxylem zakončených domén akrylátovými skupinami. Svazek kapilár, obsahující směsi akrylamidu, bisakrylamidu, N-akryoylsukcinimidu, kyseliny azobis-kyanovalekové a libovolné z vazebných reakčních činidel, popsanych v příkladech 31 až 36, se následně uvedl do kontaktu se zarovnaným povrchem, při kterém se kapiláry ocitly v zákrytu s akrylátem zakončenými doménami a došlo k přemístění předpolymeračních roztoků, obsahujících specifické sondy, na jednotlivé domény. Každá z kapilár kapilárního svazku obsahovala vazebné domény, specifické pro sledované analyty. Expozice kapek předpolymeru, rozmístěných na jednotlivých doménách UV světlem, vedla ke

tvorbě zesíťovaných gelů na podkladu na jednotlivých vazebných doménách povrchu. Test se prováděl tak, že se substrát ošetřil směsí vzorku, která by mohla obsahovat analyty, schopné navázat se na jednu nebo více vazebných domén, které se nacházejí na gelových površích v pufrovaném roztoku, obsahujícím tripropylamin a analogy analytů, značené pomocí ECL TAG1, které konkurují analytům v navázání na vazebné domény a/nebo sekundární vazebná činidla, značená pomocí ECL TAG1 pro sledované analyty. Vazebné domény 4200, 4201 a 4202 na polyakrylamidových kapkách 4203 na zlaté elektrodě 4232 se následně umístily do těsné blízkosti ITO pracovní elektrody 4204, jak ukazuje obrázek 42. Světlo, emitované z jednotlivých vazebných domén, se kvantifikovalo pomocí CCD kamery 4205 a porovnávalo s výsledky získanými pro vazebné domény vnitřních standardů, obsažených v roztoku vzorku.

Příklad 38

Vysoce reverzibilní ECL

Polykrystalické zlaté elektrody (zakoupené od společnosti Bio-Analytical Services, 2 mm²) se čistily ručním leštěním nejprve 0,5 μm a následně 0,03 μm suspenzí oxidu hlinitého, potom se chemicky leptaly ve směsi (1:3) H₂O₂/H₂SO₄ a elektrochemicky se cyklizovaly v naředěné kyselině sírové mezi -0,2 V a 1,7 V vs. Ag/AgCl. Čisté elektrody se nechaly přes noc ponořené v naředěném roztoku oktylthiolu (C₈SH), rozpuštěného v ethanolu. Adsorpce proteinu se provedla překrytím elektrod, modifikovaných C₈SH 20 μl albuminu bovinního séra značeného pomocí TAG1 (BSA), rozpuštěného v solném roztoku pufrovaném fosfátem

(PBS, 0,15 M NaCa/0,1 M NaPi, pH 7,2), a promytím povrchu přebytkem stejného pufru po desetiminutové inkubaci.

ECL se provedla ve tříelektrodovém článku s Ag/AgCl referenční elektrodou, protielektrodou, tvořenou platinovým drátem a EG&G 283 potenciostatem. Světelná intenzita se měřila pomocí fotometru Pacific Instruments a fotonky s násobičem Hamamatsu, umístěné na dně elektrochemického článku. Elektroda, která adsorbovala protein, se ponořila do roztoku 0,1 M TPA a 0,2 M fosfátu, pH 7,2. Jak ukazuje obrázek 44A, pokud se potenciál elektrody měnil v cyklu od 0,0 V do 1,2 V a zpět, potom byla pozorována vysoce reverzibilní ECL odezva (intenzita přímého scanu a zpětného scanu byla dost podobná), což ukazuje na reverzibilní povahu ECL procesu a stabilitu thiolové a proteinové vrstvy na elektrodě.

Cyklické voltametrické experimenty se prováděly na stejném vybavení jako experimenty ECL s vyloučením PMT a fotometru. U tohoto experimentu se elektroda, pokrytá C₆SH (žádný protein) umístila do roztoku 1 mM hexakynoželezitanu draselného (v PBS) a elektroda se scanovala od 0,5 V do 1,2 V a zpět a následně v dalším cyklu od + 0,5 V do - 0,3 V. To naznačuje, že monovrstva byla stále neporušena a nedesorbovala při 1,2 V, voltamogram vykazoval pouze kapacitní proud mezi + 0,5 V a - 0,3 V a nevykazoval žádný faradický proud hexakynoželezitanu (obr. 44B).

Příklad 39Kvazi-reverzibilní ECL

Výše popsaný způsob se použil k modifikování elektrody a proteinové adsorpci. V ECL experimentech se potenciál scanoval mezi 0,0 V a 1,5 V a zaznamenala se odpovídající světelná intenzita. Jak ukazuje obrázek 45A, mezi přímým a zpětným scanem jednoho cyklu a rovněž mezi různými cykly došlo k určité ECL ztrátě. Cyklické voltamogramy thiolu/Au v hexakyanoželezitanu po oxidaci při 1,5 V, vykazovaly vysokou hodnotu faradového proudu, což naznačuje, že při 1,5 V došlo alespoň k částečné desorpci thiolové monovrstvy (obr. 45B).

Příklad 40Ireverzibilní ECL

U těchto experimentů se elektroda modifikovala a protein se adsorboval stejným způsobem jako v příkladu 38. Při měření ECL se elektrodový potenciál scanoval všemi cestami do 2,0 V a zpět do 0,0 V. Intenzita světla se sledovala na přímém scanu (bylo pozorováno více světla než za reverzibilních podmínek v příkladu 38), ale na zpětném scanu poklesla na hodnotu pozadí, jak ukazuje obrázek 46A. Cyklické voltamogramy modifikované elektrody v hexakyanoželezitanu po oxidaci při 2,0 V naznačil, že došlo k desorpci většiny thiolové monovrstvy (obr. 46B).

Příklad 41

ECL sendvičový imunologický test, používající primární protilátku imobilizovanou na strukturované zlaté elektrodě

V tomto příkladu se na strukturované zlaté elektrodě, určené pro imunologické stanovení PSA imobilizovala protilátka prostatově specifického antigenu (PSA).

Známymi postupy se připravila exponovaná a vyvolaná fotorezistentní matrice o tloušťce 1 až 2 μm , která poskytla fotorezistentní vrstvu na silikonové podložce se čtverečkem o rozměrech 1 mm x 1 mm, který byl zbaven fotorezistence. Směs SYLGARD silikonového elastomeru 184 a odpovídajícího SYLGARD 184 vytvrzovacího činidla (10:1) se nalila na matrici a nechala vytvrdit. Zpolymerovaný SYLGARD 184 se opatrně sejmul ze silikonové matrice. Výsledné elastomerní „razítko“ se „smáčelo“ roztokem, obsahujícím OH-zakončený thiol, $\text{HS}-(\text{CH}_2)_{11}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_3-\text{OH}$ a thiol zakončený kyselinou nitrilotrioctovou (NTA) $\text{HS}-(\text{CH}_2)_{11}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_3\text{OC}(\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{CH}(\text{CO}_2\text{H})\text{N}(\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H})_2$ v ethanolu a uvedlo se do kontaktu se zarovnaným zlatým povrchem a sejmulo za vzniku SAM o rozměrech 1 mm x 1 mm. Substrát se promýval několik sekund roztokem obsahujícím pouze thiol zakončený hydroxylovou skupinou v ethanolu, čímž se zabránilo nespecifickému navázání proteinu vně otisku aplikovaného pomocí razítka. Výsledný povrch se následně opláchl ethanolem a vysušil pod proudem dusíku. Ošetření povrchu roztokem NiCl_2 a následné ošetření roztokem obsahujícím fúzní protein, jehož součástí jsou anti-PSA myší monoklonální a peptidová $(\text{His})_6$ vazebná místa, vedla k řízené imobilizaci fúzního proteinu na povrchu. Tento způsob poskytl reprodukovatelné a předem stanovené množství

proteinu, imobilizovaného na povrchu. Orientace proteinu na povrchu byla řízena umístěním (His)₆ sekvenční v primární struktuře fúzního proteinu. Absolutní množství imobilizovaného proteinu se řídilo poměrem NEA zakončeného thiolu ku hydroxylem zakončenému thiolu v SAM, připraveném pomocí razítka a povrchovou plochou razítkem vytištěného znaku. Kalibrační křivka pro PSA se určila přípravou roztoků obsahujících známé koncentrace PSA v séru (připravily se roztoky s koncentracemi, pohybujícími se v rozmezí od 1 fM do 1 μ M). Určitý počet povrchů, připravený výše popsaným způsobem se ošetřil PSA kalibračními standardy a následně roztokem, obsahujícím sekundární protilátku PSA (značenou pomocí derivátu TAG1) při optimální koncentraci. Kalibrační křivka se stanovila ponořením povrchů do roztoku obsahujícího 0,1 M TPA a 0,2 M fosfát (pH 7,2) a měřením maximální intenzity emitovaného světla za podmínek, kdy se elektrický potenciál zlatého povrchu cyklicky pohyboval mezi 0,0 a 2,0 V a za scanovací rychlosti 0,5 V/s. Stanovení neznámých koncentrací PSA v séru ve vzorku se provedlo stejným způsobem s tou výjimkou, že se koncentrace PSA vypočetla odečtem z kalibrační křivky pro maximální ECL signál.

17.07.98

PV 2844-97

165

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Zařízení pro detekci analytu elektrochemiluminescencí, v y z n a č e n é t í m , že obsahuje elektrodu a protielektrodu, přičemž uvedená elektroda a protielektroda mají na svém povrchu imobilizováno předem stanovené množství reakčního činidla, schopného vázat elektrochemiluminescenčně značené druhy nebo partnery elektrochemiluminescenčně značených druhů.

2. Zařízení pro detekci analytu elektrochemiluminescencí, v y z n a č e n é t í m , že obsahuje elektrodu a protielektrodu, přičemž uvedená elektroda a protielektroda mají na svém povrchu imobilizováno předem stanovené množství reakčního činidla, schopného přímo nebo nepřímo vázat elektrochemiluminescenčně značené druhy.

3. Zařízení pro detekci analytu elektrochemiluminescencí, v y z n a č e n é t í m , že obsahuje elektrodu, přičemž uvedená elektroda má na svém povrchu imobilizováno předem stanovené množství reakčního činidla, schopného vázat složku vazebného elektrochemiluminescenčního testu.

4. Zařízení podle nároku 3, v y z n a č e n é t í m , že uvedenou elektrodou je pracovní elektroda.

5. Zařízení podle nároku 3, v y z n a č e n é t í m , že uvedenou elektrodou je protielektroda.

6. Zařízení podle nároku 3, v y z n a č e n é t í m , že imobilizované reakční činidlo a elektrodový komplex jsou v podstatě tolerantní k elektronovému přenosu mezi uvedenými elektrodami a elektrochemiluminescenčním značením.

7. Zařízení podle nároku 3, v y z n a č e n é t í m , že uvedená elektroda je tvořena porézním materiálem.

8. Zařízení pro detekci analytu elektrochemiluminescencí, v y z n a č e n é t í m , že obsahuje porézní elektrodu a protielektrodu.

9. Zařízení pro detekci analytu elektrochemiluminescencí, v y z n a č e n é t í m , že obsahuje pracovní elektrodu a protielektrodu, přičemž uvedená pracovní elektroda má na svém povrchu a v elektrochemickém kontaktu s tímto povrchem imobilizováno předem stanovené

množství reakčního činidla, schopného vázat složku vazebného elektrochemiluminescenčního testu.

10. Zařízení pro detekci analytu elektrochemiluminescencí, v y z n a č e n é t í m , že obsahuje pracovní elektrodu a protielektrodu, přičemž uvedená protielektroda má na svém povrchu a v elektrochemickém kontaktu s tímto povrchem imobilizováno předem stanovené množství reakčního činidla, schopného vázat složku vazebného elektrochemiluminescenčního testu.

11. Zařízení pro detekci analytu elektrochemiluminescencí, v y z n a č e n é t í m , že obsahuje elektrodu a protielektrodu a porézní matici v elektrochemickém kontaktu s uvedenou elektrodou, přičemž uvedená porézní matrice obsahuje na svém povrchu předem stanovené množství reakčního činidla, schopného vázat složku vazebného elektrochemiluminescenčního testu.

12. Zařízení pro detekci analytu elektrochemiluminescencí, v y z n a č e n é t í m , že obsahuje pracovní elektrodu a množinu diskrétních vazebných domén, přičemž uvedené vazebné domény jsou schopny vázat složku vazebného elektrochemiluminescenčního testu.

13. Zařízení pro detekci analytu elektrochemiluminescencí, v y z n a č e n é t í m , že obsahuje

pracovní elektrodu a množinu diskretních vazebných domén, přičemž každá z uvedených vazebných domén obsahuje předem stanovené množství reakčního činidla, schopného vázat složku vazebného elektrochemiluminescenčního testu.

14. Zařízení podle nároku 13, v y z n a č e n é t í m , že dále obsahuje protielektrodu.

15. Zařízení podle nároku 13, v y z n a č e n é t í m , že dále zahrnuje protielektrodu, prostředek pro dodávku vzorku a prostředek pro detekci světla.

16. Zařízení pro detekci analytu elektrochemiluminescencí, v y z n a č e n é t í m , že obsahuje:

(a) elektrodu;

(b) množinu diskretních vazebných domén, z nichž každá obsahuje předem stanovené množství reakčního činidla, schopného vázat složku vazebného elektrochemiluminescenčního testu;

(c) protielektrodu;

(d) prostředek pro dodávku vzorku do uvedených vazebných domén;

(e) prostředek pro spouštění elektrochemiluminescence;

a

(f) prostředek pro detekci elektrochemiluminescence.

17. Zařízení pro detekci analytu elektrochemiluminescencí, v y z n a č e n é t í m , že obsahuje:

- (a) elektrodu;
- (b) podložku, která má na sobě imobilizovanu množinu diskretních vazebných domén, z nichž každá obsahuje předem stanovené množství reakčního činidla, schopného vázat složku vazebného elektrochemiluminescenčního testu;
- (c) protielektrodu;
- (d) prostředek pro dodávku vzorku do uvedených vazebných domén;
- (e) prostředek pro spouštění elektrochemiluminescence;
- a
- (f) prostředek pro detekci elektrochemiluminescence.

18. Zařízení podle nároku 17, v y z n a č e n é t í m , že uvedená množina domén je v elektrochemickém kontaktu s uvedenou elektrodou.

19. Zařízení podle nároku 17, v y z n a č e n é t í m , že uvedená elektroda je porézní.

20. Zařízení podle nároku 19, v y z n a č e n é t í m , že uvedená elektroda je tvořena uhlíkatým materiálem.

21. Zařízení podle nároku 17, v y z n a č e n é t í m , že uvedená elektroda je tvořena fibrilami.

22. Zařízení podle nároku 17, v y z n a č e n é t í m , že uvedený elektrochemiluminescenční detekční prostředek detekuje elektrochemiluminescenci z jedné nebo více diskrétních vazebných domén.

23. Zařízení podle nároku 17, v y z n a č e n é t í m , že uvedenou podložkou je porézní matrice.

24. Zařízení podle nároku 17, v y z n a č e n é t í m , že uvedenou podložkou je porézní matrice a uvedená elektroda je porézní.

25. Zařízení podle nároku 17, v y z n a č e n é t í m , že uvedenou podložkou je porézní matrice, která je uspořádána mezi uvedenou elektrodou a protielektrodou.

26. Zařízení pro detekci analytu elektrochemiluminescencí, v y z n a č e n é t í m , že obsahuje:

(a) elektrodu;

~~(b) množinu diskrétních vazebných domén, z nichž každá~~
obsahuje předem stanovené množství reakčního činidla, schopného vázat složku vazebného elektrochemiluminescenčního testu;

(c) protielektrodu;

(d) prostředek pro dodávku vzorku do uvedených vazebných domén;

(e) prostředek pro spouštění elektrochemiluminescence;

a

(f) množinu prostředků pro elektrochemiluminescenční detekci.

27. Zařízení podle nároku 26, v y z n a č e n é t í m , že uvedená množina prostředků pro elektrochemiluminescenční detekci se použije pro zobrazení jedné nebo více vazebných domén.

28. Zařízení podle nároku 27, v y z n a č e n é t í m , že alespoň jeden z množiny detekčních prostředků detekuje elektrochemiluminescenci z jedné vazebné domény.

29. Zařízení podle nároku 27, v y z n a č e n é t í m , že uvedenou množinou prostředků pro elektrochemiluminescenční detekci je CCD svazek nebo diodový svazek.

30. Zařízení pro detekci analytu elektrochemiluminescencí, v y z n a č e n é t í m , že obsahuje elektrodu mající na svém povrchu imobilizovanou množinu diskrétních vazebných domén, přičemž uvedené vazebné domény jsou schopny vázat složku vazebného elektrochemiluminescenčního testu.

31. Zařízení pro detekci analytu elektrochemiluminescencí, v y z n a č e n é t í m , že obsahuje elektrodu mající na svém povrchu imibilizovanou množinu diskretních vazebných domén, přičemž každá z uvedených vazebných domén obsahuje předem stanovené množství reakčního činidla, schopného vázat složku vazebného elektrochemiluminescenčního testu.

32. Zařízení pro detekci analytu elektrochemiluminescencí, v y z n a č e n é t í m , že obsahuje elektrodu mající na svém povrchu imibilizovanou množinu diskretních vazebných domén, které obsahují elektrochemiluminescenční označení.

33. Zařízení pro detekci analytu elektrochemiluminescencí, v y z n a č e n é t í m , že obsahuje elektrodu, mající na svém povrchu imibilizovanou množinu diskretních vazebných domén, které jsou schopny generovat množinu elektrochemiluminescenčních signálů, a proti-elektrodu.

34. Zařízení pro detekci analytu elektrochemiluminescencí, v y z n a č e n é t í m , že obsahuje podložku, mající na svém povrchu imibilizovanou množinu diskretních vazebných domén, přičemž každá z uvedených vazebných domén obsahuje předem stanovené množství reakčního činidla, schopného vázat složku vazebného elektrochemiluminescenčního testu.

35. Zařízení pro detekci analytu elektrochemiluminescencí, v y z n a č e n é t í m , že obsahuje elektrodu a podložku, mající na svém povrchu imobilizovanou množinu diskrétních vazebných domén, přičemž každá z uvedených vazebných domén obsahuje předem stanovené množství reakčního činidla, schopného vázat složku vazebného elektrochemiluminescenčního testu, přičemž uvedená elektroda a uvedené vazebné domény jsou v elektrochemickém kontaktu.

36. Zařízení podle nároku 35, v y z n a č e n é t í m , že elektrodou je pracovní elektroda.

37. Zařízení podle nároku 35, v y z n a č e n é t í m , že elektrodou je protielektroda.

38. Zařízení pro detekci analytu elektrochemiluminescencí, v y z n a č e n é t í m , že obsahuje:

(a) elektrochemický článek;

(b) první povrch, obsahující elektrodu; a

(c) druhý povrch, mající na sobě imobilizovanou množinu vazebných domén, z nichž každá obsahuje vazebné reakční činidlo, které je schopno vázat složku vazebného elektrochemiluminescenčního testu, přičemž uvedený první a druhý povrch jsou odsazeně zarovnány tak, že umožňují elektronový přenos mezi uvedenou elektrodou a elektrochemiluminescenčním označením, přímo nebo nepřímo navázaným na uvedené vazebné reakční činidlo.

39. Zařízení pro detekci analytu elektrochemiluminescencí, v y z n a č e n é t í m , že obsahuje elektrochemický článek a elektrodu, která má na sobě imobilizovanu množinu vazebných domén, z nichž každá obsahuje vazebné reakční činidlo, které je schopno vázat složku vazebného elektrochemiluminescenčního testu.

40. Způsob provádění množiny elektrochemiluminescenčních testů, v y z n a č e n ý t í m , že zahrnuje:

(a) uvedení množiny diskrétních vazebných domén do kontaktu se vzorkem, obsahujícím jeden sledovaný analyt nebo množinu sledovaných analytů, za testovacích podmínek;

(b) vyvolání elektrochemiluminescence v jedné nebo více doménách z množiny vazebných domén; a

(c) detekování elektrochemiluminescence na množině uvedených vazebných domén.

41. Způsob provádění množiny elektrochemiluminescenčních testů pro množinu různých sledovaných analytů, v y z n a č e n ý t í m , že zahrnuje:

(a) uvedení množiny diskrétních vazebných domén do kontaktu se vzorkem, obsahujícím množinu sledovaných analytů, za testovacích podmínek;

(b) souběžné vyvolání elektrochemiluminescence v množině vazebných domén; a

(c) souběžné detekování elektrochemiluminescence na množině uvedených vazebných domén.

42. Výrobek, v y z n a č e n ý t í m , že obsahuje množinu diskretních vazebných domén na podložce, přičemž uvedené vazebné domény jsou vzájemně prostorově uspořádány a mají různou vazebnou specifičnost pro navázání množiny různých sledovaných analytů v elektro-chemiluminescenčním testu.

43. Výrobek, v y z n a č e n ý t í m , že obsahuje množinu diskretních vazebných domén na podložce, přičemž uvedené vazebné domény jsou vzájemně prostorově uspořádány a mají různou vazebnou specifičnost pro navázání sledovaného analytu v elektrochemiluminescenčním testu, přičemž každá doména obsahuje jinou vazebnou složku navázanou na jiném sledovaném analytu.

44. Výrobek, v y z n a č e n ý t í m , že obsahuje množinu diskretních vazebných domén na podložce, přičemž uvedené vazebné domény jsou vzájemně prostorově uspořádány a mají různou vazebnou specifičnost pro analyt sledovaný v elektrochemiluminescenčním testu, přičemž každá doména je navázána přímo nebo nepřímo na jiný sledovaný analyt a zbytek schopný elektrochemiluminescence.

45. Výrobek, v y z n a č e n ý t í m , že obsahuje množinu diskretních vazebných domén na podložce obsahující porézní materiál, přičemž uvedené vazebné domény jsou vzájemně prostorově uspořádány a mají různou vazebnou specifičnost pro analyt sledovaný v elektrochemi-

luminescenčním testu, přičemž každá doména obsahuje jinou vazebnou složku, navázanou na jiném sledovaném analytu.

46. Výrobek podle nároku 45, v y z n a č e n ý t í m , že uvedený porézní materiál obsahuje uhlík.

47. Výrobek podle nároku 45, v y z n a č e n ý t í m , že uvedený porézní materiál obsahuje fibrily.

48. Výrobek, v y z n a č e n ý t í m , že obsahuje množinu diskrétních vazebných domén na podložce obsahující funkcionalizované fibrily, přičemž uvedené vazebné domény jsou vzájemně prostorově uspořádány a mají různou vazebnou specifičnost pro analyt sledovaný v elektrochemiluminescenčním testu, přičemž každá doména je navázána přímo nebo nepřímo na sledovaný analyt a zbytek, který je schopen elektrochemiluminescence.

49. Výrobek, v y z n a č e n ý t í m , že obsahuje množinu diskrétních vazebných domén na podložce obsahující jednu nebo několik polymerních matric, přičemž uvedené vazebné domény jsou vzájemně prostorově uspořádány a mají různou vazebnou specifičnost pro analyt sledovaný v elektrochemiluminescenčním testu, přičemž každá doména je navázána přímo nebo nepřímo na sledovaný analyt a zbytek, který je schopen elektrochemiluminescence.

50. Kazeta pro detekci analytu ve vzorku elektrochemiluminescencí, v y z n a č e n á t í m , že obsahuje:

- (a) množinu diskretních vazebných domén na podložce; a
- (b) jeden nebo více párů elektrod a protielektrod.

51. Kazeta pro detekci analytu ve vzorku elektrochemiluminescencí, v y z n a č e n á t í m , že obsahuje:

- (a) množinu diskretních vazebných domén na podložce; a
- (b) jeden nebo více párů elektrod a protielektrod prostorově zarovnaných s uvedenými vazebnými doménami; a
- (c) prostředek pro dopravu vzorku do množiny diskretních vazebných domén.

52. Kazeta podle nároku 49, v y z n a č e n á t í m , že uvedená množina diskretních vazebných domén tvoří alespoň jeden povrch, schopný vázat složku vazebného elektrochemiluminescenčního testu.

53. Kazeta podle nároku 50, v y z n a č e n á t í m , že uvedená množina vazebných domén zahrnuje vazebné domény, které mají různé vazebné specifčnosti, pro souběžné navázání množiny různých sledovaných analytů ve vzorku.

54. Kazeta pro detekování nebo měření elektrochemiluminescence, v y z n a č e n á t í m , že obsahuje:

(a) první podložku mající na sobě množinu diskrétních vazebných domén;

(b) množinu elektrodových a protielektrodových párů, přičemž každá z množiny diskrétních vazebných domén je v zákrytu s jedním z uvedené množiny párů elektrod a protielektrod a uvedené elektrodové a protielektrodové páry a vazebné domény tvoří množinu článků pro detekci nebo provádění měření elektrochemiluminescence, přičemž uvedené elektrodové a protielektrodové páry jsou adresovatelné zdrojem elektrické energie ve formě napěťové vlny, účinné pro spuštění elektrochemiluminescence; a

(c) prostředek pro dodávku vzorku do množiny diskrétních vazebných domén.

55. Kazeta podle nároku 53, v y z n a č e n á t í m , že množina vazebných domén zahrnuje vazebné domény, které mají odlišné vazebné specifičnosti pro souběžné navázání množiny různých sledovaných analytů ve vzorku.

56. Kazeta pro detekování nebo měření sledovaného analytu ve vzorku, v y z n a č e n á t í m , že obsahuje:

(a) první podložku mající na svém povrchu množinu diskrétních vazebných domén, přičemž alespoň jedna z uvedených vazebných diskrétních domén má odlišnou specifičnost než ostatní vazebné domény a každá z uvedené

množiny diskretních vazebných domén je hydrofilní a obklopená hydrofobními oblastmi;

(b) druhou podložku, která má množinu hydrofilních domén, obsahujících reakční médium vhodné pro provádění chemického testu; a

(c) prostředek pro uvedení množiny diskretních vazebných domén a množiny reakčních médií do kontaktu, při kterém se analyzovaný vzorek, který je přítomen na jednotlivých doménách, kontaktuje s reakčním médiem.

57. Kazeta podle nároku 50, v y z n a č e n á t í m , že uvedené diskretní vazebné domény dále zahrnují vnitřní kontrolu.

58. Způsob přípravy množiny diskretních vazebných domén na podložce obsahující vazebná reakční činidla, schopná vázat sledované analyty, v y z n a č e n ý t í m , že zahrnuje:

(a) vytvoření samočinně vytvořené monovrstvy na podložce, přičemž uvedená monovrstva zahrnuje na povrchu, který nepřiléhá k podložce, vazebnou skupinu A, schopnou specificky vázat vazebnou skupinu B; a

(b) kontaktování uvedené první vazebné skupiny A s vazebným činidlem, které je schopno vázat sledovaný analyt, přičemž uvedené vazebné reakční činidlo je navázáno na uvedenou vazebnou skupinu B, takže uvedená vazebná reakční činidla je navázáno na monovrstvě pomocí A:B vazby a tvoří vazebný povrch, který je organizován jako množina diskretních vazebných domén.

59. Způsob podle nároku 57, v y z n a č e n ý t í m , že na množinu diskretních vazebných domén je navázána množina různých vazebných reakčních činidel a kontaktování první vazebné skupiny A s reakčním činidlem se provádí dodáním množiny kapalinových vzorků, z nichž každý obsahuje jiné vazebné činidlo, z množiny kapalinových vodičů na uvedenou monovrstvu.

60. Způsob detekce nebo měření analytu v elektrochemiluminescenčním vazebném testu, v y z n a č e n ý t í m , že zahrnuje:

(a) kontaktování množiny diskretních vazebných domén imobilizovaných na povrchu jedné nebo několika podložek se vzorkem, obsahujícím množinu analytů a složku uvedeného testu, navázanou na elektrochemiluminescenční označení;

(b) aplikování napěťové vlny, účinné pro spuštění elektrochemiluminescence na jedné nebo více doménách v přítomnosti reakčního média, které je vhodné pro provádění elektrochemiluminescenčního testu; a

(c) detekci nebo měření elektrochemiluminescence z uvedené množiny domén.

61. Sada pro provádění množiny elektrochemiluminescenčních testů pro množinu sledovaných analytů, v y z n a č e n á t í m , že obsahuje:

(a) výrobek obsahující množinu diskretních vazebných domén na podložce, přičemž uvedené vazebné domény jsou vzájemně prostorově uspořádány a mají různé vazebné specifčnosti pro množinu různých sledovaných analytů v elektrochemiluminescenčním testu; a

(b) nádobu, obsahující reakční činidlo nezbytné pro provádění uvedených testů.

62. Sada podle nároku 60, v y z n a č e n á t í m , že dále obsahuje zařízení pro provádění uvedených testů.

63. Sada pro provádění množiny elektrochemiluminescenčních testů pro množinu sledovaných analytů, v y z n a č e n á t í m , že obsahuje nádobu, obsahující vazebné složky specifické pro množinu různých analytů, které jsou použitelné v množině elektrochemiluminescenčních testů.

64. Sada podle nároku 62, v y z n a č e n á t í m , že dále obsahuje jednu nebo několik nádob, obsahujících nevazebné složky pro množinu elektrochemiluminescenčních testů.

65. Sada podle nároku 62, v y z n a č e n á t í m , že dále obsahuje výrobek, který obsahuje množinu diskrétních vazebných domén na podložce, přičemž uvedené vazebné domény jsou vzájemně prostorově uspořádány a mají různé vazebné specifčnosti pro množinu různých sledovaných analytů v elektrochemiluminescenčním testu.

66. Kazeta, v y z n a č e n á t í m , že obsahuje:

(a) množinu diskretních vazebných domén na podložce, tvořící alespoň jeden vazebný povrch;

(b) množinu elektrodových a protielektrodových párů, přičemž uvedené diskretní vazebné domény jsou prostorově zarovnány s uvedenou množinou elektrodových a protielektrodových párů; a

(c) prostředek pro dodávku vzorku do uvedené množiny diskretních vazebných domén.

67. Kazeta, v y z n a č e n á t í m , že obsahuje:

(a) množinu diskretních vazebných domén na podložce, tvořící alespoň jeden vazebný povrch; a

(b) množinu elektrodových a protielektrodových párů, přičemž uvedené diskretní vazebné domény jsou prostorově zarovnány s uvedenou množinou elektrodových a protielektrodových párů a mohou být uvedeny do blízkosti této množiny elektrodových a protielektrodových párů, přičemž uvedené vazebné domény jsou hydrofilní nebo hydrofobní, vzhledem k povrchu podložky.

68. Kazeta, v y z n a č e n á t í m , že obsahuje:

(a) množinu diskretních vazebných domén na první podložce; tvořící alespoň jeden vazebný povrch; a

(b) množinu elektrodových a protielektrodových párů, přičemž uvedené diskretní vazebné domény jsou prostorově zarovnány s uvedenou množinou elektrodových a protielektrodových párů, množina elektrod se nachází na uvedeném vazebném povrchu, každá elektroda sousedí s vazebnou doménou a protielektrody se nacházejí na druhé podložce; a

(c) prostředek pro dodávku vzorku do množiny diskrétních vazebných domén.

69. Kazeta podle nároku 68, v y z n a č e n á t í m , že uvedené vazebné domény jsou hydrofilní nebo hydrofobní, vzhledem k povrchu podložky.

70. Kazeta podle nároku 66, v y z n a č e n á t í m , že uvedená podložka obsahuje 2 až 500 vazebných domén.

71. Kazeta podle nároku 66, v y z n a č e n á t í m , že uvedená množina vazebných domén obsahuje vazebné domény mající různé vazebné specifčnosti pro souběžné navázání množiny různých sledovaných analytů, přítomných ve vzorku.

72. Kazeta pro detekci nebo měření elektrochemiluminescence, v y z n a č e n á t í m , že obsahuje:

(a) první podložku, která má na sobě množinu diskrétních vazebných domén;

(b) množinu elektrodových a protielektrodových párů, přičemž uvedené vazebné domény jsou v zákrytu s množinou elektrodových a protielektrodových párů a v jejich blízkosti, a diskrétní vazebné domény tvoří spolu s elektrodovými a protielektrodovými páry množinu článků pro detekci nebo provádění měření elektrochemiluminescence,

příčemž uvedené elektrodové a protielektrodové páry jsou adresovatelné zdrojem elektrické energie ve formě napěťové vlny, účinné pro spuštění elektrochemiluminescence; a

(c) prostředek pro dodávku vzorku do uvedené množiny diskrétních vazebných domén.

73. Kazeta podle nároku 72, v y z n a č e n á t í m , že dále obsahuje druhou podložku, kterou lze umístit vedle první podložky tak, že mezi sebou vymezí prostředek pro umístění vzorku, přičemž množina elektrodových a protielektrodových párů je fixována ke druhé podložce.

74. Kazeta podle nároku 72, v y z n a č e n á t í m , že uvedená množina elektrodových a protielektrodových párů je fixována k uvedené první podložce.

75. Kazeta podle nároku 72, v y z n a č e n á t í m , že dále obsahuje druhou podložku, kterou lze umístit vedle první podložky tak, že mezi sebou vymezí prostředek pro umístění vzorku, přičemž množina elektrod je umístěna na první podložce a množina protielektrod je umístěna na druhé podložce, takže množina elektrod a protielektrod může být umístěna do vzájemné blízkosti.

76. Kazeta podle nároku 72, v y z n a č e n á t í m , že uvedená množina diskrétních vazebných domén obsahuje 5 až 1 000 vazebných domén.

77. Kazeta podle nároku 72, v y z n a č e n á t í m , že uvedená množina diskrétních vazebných domén obsahuje alespoň jednu vazebnou doménu, která obsahuje vazebná reakční činidla, která jsou vzájemně identická a která se liší svou specifičností od vazebných reakčních činidel obsažených v jiných vazebných doménách, pro navázání množiny různých sledovaných analytů.

78. Kazeta podle nároku 72, v y z n a č e n á t í m , že uvedená množina diskrétních vazebných domén obsahuje alespoň jednu vazebnou doménu, která obsahuje vazebná reakční činidla, která se liší svou vazebnou specifičností.

79. Kazeta podle nároku 78, v y z n a č e n á t í m , že dále obsahuje reflexní povrch, přilehlý k uvedené první nebo druhé podložce.

80. Kazeta podle nároku 78, v y z n a č e n á t í m , že uvedená první a druhá podložka, množina diskrétních vazebných domén a množina elektrodových a protielektrodových párů jsou v podstatě transparentní.

17.07.98

186

81. Kazeta podle nároku 72, v y z n a č e n á t í m , že průměr nebo šířka uvedených elektrodových a protielektrodových párů se pohybuje v rozmezí od 0,001 do 10 mm.

82. Kazeta podle nároku 80, v y z n a č e n á t í m , že průměr nebo šířka uvedených vazebných domén se pohybuje v rozmezí od 0,001 do 10 mm.

83. Kazeta podle nároku 72, v y z n a č e n á t í m , že každý z uvedených elektrodových a protielektrodových párů je samostatně adresovatelný alespoň jedním zdrojem elektrické energie.

84. Kazeta podle nároku 72, v y z n a č e n á t í m , že uvedené vazebné domény jsou hydrofilní a jsou obklopeny hydrofobním povrchem.

85. Kazeta podle nároku 72, v y z n a č e n á t í m , že uvedené vazebné domény jsou hydrofobní a jsou obklopeny hydrofilním povrchem.

86. Kazeta podle nároku 72, v y z n a č e n á t í m , že uvedený vazebný povrch obsahuje strukturovanou, samočinně sestavenou monovrstvu.

87. Kazeta podle nároku 86, v y z n a č e n á t í m , že uvedená samočinně sestavená monovrstva obsahuje alkanthioly.

88. Kazeta podle nároku 87, v y z n a č e n á t í m , že uvedené vazebné domény jsou schopny vázat analyty, zvolené ze skupiny zahrnující proteiny, nukleové kyseliny, karbohydrátové zbytky, protilátky, antigeny, buňky, organické sloučeniny a organokovové sloučeniny.

89. Kazeta podle nároku 72, v y z n a č e n á t í m , že uvedené vazebné domény obsahují funkční reakční činidla pro testy, zvolené ze skupiny zahrnující klinické chemické testy, chemiluminescenční testy, imunologické testy a testy s nukleokyselinovými sondami.

90. Kazeta podle nároku 73, v y z n a č e n á t í m , že dále obsahuje odstranitelnou elektrodovou ochrannou bariéru vloženou mezi uvedenou druhou podložku a uvedené diskrétní vazebné domény, přičemž uvedená elektrodová ochranná bariéra je odstranitelná před spuštěním elektrochemiluminescence.

91. Kazeta podle nároku 72, v y z n a č e n á t í m , že dále obsahuje elektricky vodivý materiál na množině elektrod uvedených elektrodových párů nebo v jejich

blízkosti umístěný tak, aby šířil elektrický potenciál z povrchu elektrody do testovacího média.

92. Zařízení pro měření elektrochemiluminescence vzorku, v y z n a č e n é t í m , že obsahuje:

(a) množinu článků pro udržování alespoň jednoho vzorku, která je tvořena množinou elektrodových a protielektrodových párů a první podložkou, která obsahuje množinu diskretních vazebných domén, která je zarovnána s množinou elektrodových a protielektrodových párů a nachází se v jejich blízkosti, přičemž uvedené elektrodové a protielektrodové páry jsou samostatně adresovatelné a uvedené články jsou vhodné pro provádění měření elektrochemiluminescence;

(b) prostředek pro regulaci napětí přizpůsobený pro aplikaci řízené napětové vlny na množinu elektrodových a protielektrodových párů, přičemž uvedená napětová vlna je účinná pro spuštění elektrochemiluminescence v množině článků; a

(c) fotonový detekční prostředek pro detekci elektrochemiluminescence z uvedeného vzorku.

93. Sada, vhodná pro měření elektrochemiluminescence, v y z n a č e n á t í m , že obsahuje jeden nebo několik zásobníků

(a) množiny diskretních vazebných domén na podložce, tvořící alespoň jeden vazebný povrch; a

(b) množiny elektrodových a protielektrodových párů, které jsou prostorově zarovnány s množinou diskretních

vazebných domén a mohou být umístěny do blízkosti těchto domén.

94. Sada podle nároku 93, v y z n a č e n á t í m , že dále obsahuje alespoň jednu druhou podložku, která může být umístěna vedle podložky s vazebným povrchem a poskytnout prostředek pro uložení vzorku.

95. Sada podle nároku 94, v y z n a č e n á t í m , že uvedená druhá vrstva nese množinu elektrodových a protielektrodových párů, které mohou být zarovnány s množinou diskrétních vazebných domén a umístěny do jejich blízkosti.

96. Sada podle nároku 93, v y z n a č e n á t í m , že dále obsahuje reakční činidla, vhodná pro provádění elektrochemiluminescenčního testu, a předem stanovené množství vyčištěného sledovaného analytu.

~~97. Kazeta pro detekci nebo měření sledovaného analytu~~
ve vzorku, v y z n a č e n á t í m , že obsahuje:

(a) první podložku, která má na svém povrchu množinu diskrétních vazebných domén a tvoří alespoň jeden vazebný povrch, přičemž alespoň některé z uvedených diskrétních vazebných domén mají jiné vazebné specifčnosti než další vazebné domény a každá z množiny vazebných domén je hydrofilní a obklopena hydrofobními oblastmi; a

(b) druhá podložka, která má na svém povrchu množinu hydrofilních domén obsahujících reakční média, vhodná pro provádění chemického testu a tvoří testovací povrch, přičemž množina diskrétních vazebných domén a množina reakčních médií může být uvedena do kontaktu, při kterém se analyzovaný vzorek, přítomný na každé vazebné doméně, uvede do kontaktu s reakčním médiem za účelem detekce nebo měření sledovaného analytu.

98. Kazeta podle nároku 72, v y z n a č e n á t í m , že dále obsahuje prostředky řídící teplotu.

99. Kazeta pro provádění sledované reakce, v y z n a č e n á t í m , že zahrnuje:

(a) první podložku, která má na svém povrchu množinu diskrétních vazebných domén, přičemž každá z uvedených domén je hydrofilní a obklopena hydrofobní oblastí na uvedeném prvním nosném povrchu; a

(b) druhá podložka, která má na svém povrchu množinu vazebných diskrétních domén, přičemž každá z uvedených vazebných domén (i) je hydrofilní a obklopena hydrofobní oblastí na uvedeném druhém povrchu, (ii) obsahuje reakční médium vhodné pro provádění sledované reakce a (iii) je prostorově zarovnána s doménou na povrchu uvedené první podložky, takže uvedená druhá podložka může být umístěna tak, že se každá z uvedených domén na povrchu druhé podložky dostane do kontaktu s doménou na povrchu první podložky se kterou je zarovnána.

100. Kazeta podle nároku 66, v y z n a č e n á t í m , že uvedené diskrétní vazebné domény dále obsahují vnitřní kontrolu.

101. Zařízení podle nároku 92, v y z n a č e n é t í m , že uvedená množina diskrétních vazebných domén zahrnuje alespoň dvě identické vazebné domény.

102. Vazebný povrch, v y z n a č e n ý t í m , že je produktem následujícího postupu:

(a) vytvoření samočinně sestavené monovrstvy na podložce, přičemž uvedená monovrstva obsahuje první vazebnou skupinu A na povrchu monovrstvy, která nesousedí s podložkou a která je schopna se specificky vázat na druhou vazebnou skupinu B, přičemž uvedená monovrstva se aplikuje alespoň na jednu doménu na uvedené podložce; a

(b) kontaktování uvedené první vazebné skupiny A s vazebným reakčním činidlem, které je schopno se vázat na sledovaný analyt, přičemž uvedené vazebné reakční činidlo se naváže na uvedenou vazebnou skupinu B, takže uvedené vazebné činidlo se přes vazbu A:B naváže na uvedenou monovrstvu a tvoří vazebný povrch, který je organizován jako množina diskrétních vazebných domén obsahujících uvedená vazebná reakční činidla, schopná se vázat na sledovaný analyt.

103. Zařízení, v y z n a č e n é t í m , že obsahuje vazebný povrch podle nároku 102.

104. Kazeta podle nároku 66, v y z n a č e n á t í m , že uvedená podložka obsahuje elastomerní materiál.

105. Způsob přípravy množiny diskrétních vazebných domén na povrchu, v y z n a č e n ý t í m , že zahrnuje:

(a) vytvoření samočinně sestavené monovrstvy na podložce, přičemž uvedená monovrstva obsahuje první vazebnou skupinu A na povrchu monovrstvy, která nesousedí s podložkou a která je schopna se specificky vázat na druhou vazebnou skupinu B, přičemž uvedená monovrstva se aplikuje alespoň na jednu doménu na uvedené podložce; a

(b) kontaktování uvedené první vazebné skupiny A s vazebným reakčním činidlem, které je schopno se vázat na sledovaný analyt, přičemž uvedené vazebné reakční činidlo se naváže na uvedenou vazebnou skupinu B, takže uvedené vazebné činidlo se přes vazbu A:B naváže na uvedenou monovrstvu a tvoří vazebný povrch, který je organizován jako množina diskrétních vazebných domén obsahujících uvedená vazebná reakční činidla, schopná se vázat na sledovaný analyt.

106. Způsob podle nároku 105, v y z n a č e n ý t í m , že v kroku (a) se uvedená monovrstva produkuje jako vzor na uvedené podložce způsobem, zvoleným ze skupiny, zahrnující mikroleptání, nanášení mikroperem a nanášení mikrorazítkem.

107. Způsob podle nároku 105, v y z n a č e n ý t í m , že uvedené reakční činidlo se zvolí ze skupiny zahrnující proteiny a jejich fragmenty a deriváty, a nukleové kyseliny a jejich fragmenty a deriváty.

108. Způsob podle nároku 105, v y z n a č e n ý t í m , že uvedené vazebné činidlo se zvolí ze skupiny zahrnující protilátky a jejich vazebné fragmenty, antigeny, epitopy, buňky a součásti buněk, enzymy, enzymové substráty, lektiny, protein A, protein G, organické sloučeniny, organokovové sloučeniny a uhlohydrátové zbytky.

109. Způsob podle nároku 105, v y z n a č e n ý t í m , že uvedené vazebné činidlo obsahuje množinu různých vazebných reakčních činidel a uvedený kontaktní krok se provádí dodáním množiny kapalných vzorků, z nichž každý obsahuje jiné vazebné činidlo, ze svazku kapalných vodičů na uvedenou monovrstvu, takže diskrétní vazebné domény vazebného povrchu na uvedené monovrstvě mají na sobě navázána jiná vazebná činidla.

110. Způsob detekce nebo měření elektrochemiluminescence, v y z n a č e n ý t í m , že zahrnuje:

(a) kontaktování množiny diskrétních vazebných domén, uspořádaných na povrchu jedné nebo několika podložek, se vzorkem obsahujícím molekuly, navázané na elektrochemiluminescenčním označení;

(b) aplikaci napětové vlny účinné pro spuštění elektrochemiluminescence na každý z množiny elektrodových a protielektrodových párů, které jsou prostorově zarovnány s uvedenou množinou diskrétních vazebných domén a nachází se v jejich blízkosti; a

(c) detekci nebo měření elektrochemiluminescence.

111. Způsob podle nároku 110, v y z n a č e n ý t í m , že uvedená množina diskrétních vazebných domén obsahuje 5 až 1000 vazebných domén.

112. Způsob podle nároku 110, v y z n a č e n ý t í m , že uvedená množina diskrétních vazebných domén obsahuje alespoň jednu vazebnou doménu, která obsahuje vazebná reakční činidla, která jsou vzájemně identická a která se liší svou specifičností od vazebných reakčních činidel obsažených v jiných doménách, což umožňuje navázání množiny různých sledovaných analytů.

113. Způsob podle nároku 110, v y z n a č e n ý t í m , že uvedená podložka dále obsahuje reflexní povrch.

114. Způsob podle nároku 110, v y z n a č e n ý t í m , že uvedená podložka, vazebný povrch a elektrodové a protielektrodové páry jsou v podstatě transparentní.

115. Způsob podle nároku 110, v y z n a č e n ý t í m , že průměr nebo šířka uvedených vazebných domén se pohybuje v rozmezí od 0,001 do 10 mm.

116. Způsob podle nároku 110, v y z n a č e n ý t í m , že každý z uvedených elektrodových a protielektrodových párů je samostatně adresovatelný alespoň jedním zdrojem elektrické energie.

117. Způsob podle nároku 110, v y z n a č e n ý t í m , že uvedené vazebné domény jsou hydrofilní a jsou obklopeny hydrofobním povrchem.

118. Způsob podle nároku 110, v y z n a č e n ý t í m , že uvedené vazebné domény jsou hydrofobní a jsou obklopeny hydrofilním povrchem.

119. Způsob podle nároku 110, v y z n a č e n ý t í m , že uvedený vazebný povrch obsahuje strukturované, samočinně sestavené monovrstvy.

120. Způsob podle nároku 119, v y z n a č e n ý t í m , že uvedené vazebné domény jsou schopny se specificky vázat na analyt, zvolený ze skupiny zahrnující proteiny, nukleové kyseliny, karbohydrátové zbytky,

protilátky, antigeny, buňky a buněčné součásti, organické sloučeniny a organokovové sloučeniny.

121. Způsob podle nároku 110, v y z n a č e n ý t í m , že dále zahrnuje kontaktování uvedených vazebných domén s reakčním médiem vhodným pro provádění testu, zvoleného ze skupiny zahrnující klinické chemické testy, chemiluminescenční testy, imunologické testy a testy s nukleokyselinovými sondami.

122. Způsob podle nároku 110, v y z n a č e n ý t í m , že uvedená jedna nebo několik podložek tvoří množinu podložek uspořádaných nad sebou a alespoň část uvedených podložek je v podstatě transparentní pro světlo, generované elektrochemiluminescencí, přičemž každá z uvedené množiny podložek je umístěna vedle další z uvedených podložek.

123. Způsob detekce nebo měření elektrochemiluminescence ve vzorku, v y z n a č e n ý t í m , že obsahuje:

(a) uvedení jedné nebo více z množiny diskrétních vazebných domén, která je situovaná na povrchu jedné nebo více podložek, do kontaktu se vzorkem, obsahujícím molekuly navázané na elektrochemiluminescenční označení, přičemž množina elektrodových a protielektrodových párů je prostorově zarovnána s uvedenou množinou diskrétních vazebných domén, přičemž množina elektrodových a

protielektrodových párů se nachází na povrchu druhém podložky;

(b) umístění uvedeného povrchu druhé podložky do blízkosti uvedeného vazebného povrchu, při kterém se každý elektrodový a protielektrodový pár dostane do blízkosti jiné vazebné domény;

(c) aplikaci napěťové vlny, účinné pro spuštění elektrochemiluminescence na každou z množiny elektrodových a protielektrodových párů; a

(d) detekci nebo měření uvedené elektrochemiluminescence.

124. Způsob podle nároku 110, v y z n a č e n ý t í m , že v průběhu kroku (a) je uvedená množina elektrodových a protielektrodových párů chráněna před vzorkem odstranitelnou elektrodovou ochrannou bariérou a uvedený způsob dále zahrnuje odstranění uvedené bariéry před aplikací napěťové vlny.

125. Způsob detekce nebo měření sledovaného analytu ve vzorku, v y z n a č e n ý t í m , že zahrnuje:

(a) umístění kapek vzorku obsahujícího analyt, který má být detekován nebo měřen, na množinu diskrétních vazebných domén na povrchu podložky, které obsahují alespoň jednu vazebnou doménu obsahující vazebná reakční činidla, která jsou vzájemně identická a která se liší svou vazebnou specifičností od vazebných reakčních činidel obsažených uvnitř dalších vazebných domén, přičemž každá z uvedených vazebných domén je charakterizována buď jako hydrofobní nebo hydrofilní, pod podmínkou, že oblast uvedeného nosného

povrchu, obklopujícího každou vazebnou doménu, je (i) hydrofobní, pokud je uvedená vazebná doména hydrofilní a (ii) hydrofilní, pokud je uvedená vazebná doména hydrofobní, což umožní uvedenému jednomu nebo více sledovaným analytům ve vzorku navázat se na uvedené vazebné domény;

(b) uvedení uvedených kapek na první podložce do kontaktu s druhou podložkou, mající množinu diskretních hydrofilních domén, obsahujících reakční média vhodná pro provádění chemického testu; a

(c) stanovení přítomnosti uvedených sledovaných analytů, které jsou navázány na uvedenou vazebnou doménu.

126. Způsob detekce nebo měření sledovaného analytu ve vzorku, v y z n a č e n ý t í m , že zahrnuje:

(a) umístění kapek vzorku obsahujícího analyt, který má být detekován nebo měřen, na množinu diskretních vazebných domén na povrchu podložky, které obsahují alespoň jednu vazebnou doménu obsahující vazebná reakční činidla, která jsou vzájemně identická a která se liší svou vazebnou specifičností od vazebných reakčních činidel obsažených uvnitř dalších vazebných domén, přičemž každá z uvedených vazebných domén je charakterizována buď jako hydrofobní nebo hydrofilní, pod podmínkou, že oblast uvedeného nosného povrchu, obklopujícího každou vazebnou doménu, je (i) hydrofobní, pokud je uvedená vazebná doména hydrofilní a (ii) hydrofilní, pokud je uvedená vazebná doména hydrofobní, což umožní uvedenému jednomu nebo více sledovaným analytům ve vzorku navázat se na uvedené vazebné domény;

(b) uvedení uvedených kapek reakčního média na uvedeně kapky vzorku; a

(c) stanovení přítomnosti uvedených sledovaných analytů, které jsou navázány na uvedenou vazebnou doménu.

127. Způsob detekce nebo měření elektrochemiluminescence ve vzorku, v y z n a č e n ý t í m , že zahrnuje následující kroky ve stanoveném pořádku:

(a) kontaktování vzorku s povrchem podložky, který obsahuje množinu diskretních vazebných domén, které jsou prostorově zarovnány s množinou elektrodových a protielektrodových párů a mohou být k této množině přiblíženy;

(b) umístění uvedených vazebných domén do blízkosti množiny elektrodových a protielektrodových párů;

(c) aplikaci napěťové vlny, účinné pro spuštění elektrochemiluminescence; a

(d) detekci a měření elektrochemiluminescence.

128. Způsob detekce nebo měření elektrochemiluminescence ve vzorku, v y z n a č e n ý t í m , že zahrnuje:

(a) kontaktování vzorku s povrchem podložky který obsahuje množinu diskretních vazebných domén;

(b) scanování elektrodového a protielektrodového páru přes povrch uvedené podložky v blízkosti uvedených vazebných domén za současné aplikace napěťové vlny, účinné pro spuštění elektrochemiluminescence; a

(d) detekci a měření elektrochemiluminescence.

129. Způsob podle nároku 109, v y z n a č e n ý t í m , že se každá z uvedených vazebných domén připraví tak, že bude prostorově zarovnána s množinou elektrodových a protielektrodových párů a bude se nacházet v její blízkosti.

130. Způsob detekce nebo měření sledovaného analytu ve vzorku, v y z n a č e n ý t í m , že zahrnuje:

(a) kontaktování vzorku s povrchem podložky, který obsahuje množinu diskrétních vazebných domén, které jsou prostorově zarovnány s množinou elektrodových a protielektrodových párů a mohou být k této množině přiblíženy, přičemž uvedené vazebné domény (i) obsahují elektrochemiluminescenční označení a (ii) jsou schopny vázat sledovaný analyt, přičemž kontaktování se provádí za podmínek, při kterých může navázání libovolného analytu ve vzorku na uvedené vazebné domény proběhnout;

(b) umístění uvedených vazebných domén do blízkosti množiny elektrodových a protielektrodových párů;

(c) aplikaci napětové vlny, účinné pro spuštění elektrochemiluminescence; a

(d) detekci a měření elektrochemiluminescence, přičemž snížení elektrochemiluminescence v porovnání s elektrochemiluminescencí pozorovanou v případě, že se neprovede kontaktní krok nebo se provede v nepřítomnosti sledovaného analytu ve vzorku naznačuje přítomnost určitého množství uvedeného analytu ve vzorku.

131. Způsob detekce nebo měření sledovaného analytu ve vzorku, v y z n a č e n ý t í m , že zahrnuje:

(a) kontaktování vzorku s povrchem podložky, který obsahuje množinu diskretních vazebných domén, které jsou prostorově zarovnány s množinou elektrodových a protielektrodových párů a mohou být k této množině přiblíženy, přičemž uvedené vazebné domény jsou schopny vázat sledovaný analyt, přičemž kontaktování se provádí za podmínek, při kterých může navázání libovolného analytu ve vzorku na uvedené vazebné domény proběhnout a uvedený vzorek obsahuje molekuly, které jsou navázány na elektrochemiluminescenční označení;

(b) umístění uvedených vazebných domén do blízkosti množiny elektrodových a protielektrodových párů;

(c) aplikaci napětové vlny, účinné pro spuštění elektrochemiluminescence; a

(d) detekci a měření elektrochemiluminescence, přičemž zvýšení elektrochemiluminescence oproti hodnotám pozadí naznačuje přítomnost určitého množství uvedeného analytu ve vzorku.

132. Způsob detekce nebo měření sledovaného analytu ve vzorku, v y z n a č e n ý t í m , že zahrnuje:

(a) kontaktování vzorku s povrchem podložky, který obsahuje množinu diskretních vazebných domén, které jsou prostorově zarovnány s množinou elektrodových a protielektrodových párů a mohou být k této množině přiblíženy, přičemž uvedené vazebné domény jsou schopny vázat sledovaný analyt, přičemž kontaktování se provádí za podmínek, při kterých může navázání libovolného analytu ve vzorku na uvedené vazebné domény proběhnout;

(b) umístění uvedených vazebných domén do kontaktu s vazebným partnerem sledovaného analytu, který je navázán na elektrochemiluminescenční označení;

(c) umístění uvedených vazebných domén do blízkosti množiny elektrodových a protielektrodových párů;

(d) aplikaci napětové vlny, účinné pro spuštění elektrochemiluminescence; a

(d) detekci a měření elektrochemiluminescence, přičemž zvýšení elektrochemiluminescence oproti hodnotám pozadí naznačuje přítomnost určitého množství uvedeného analytu ve vzorku.

133. Způsob podle nároku 131, v y z n a č e n ý t í m , že krok (a) a krok (b) se provádějí souběžně.

134. Způsob podle nároku 131, v y z n a č e n ý t í m , že se krok (a) provádí před krokem (b) a promývání vazebných domén za účelem odstranění nenavázaného analytu se provádí po ukončení kroku (a) a před započítáním kroku (b).

135. Způsob detekce nebo měření sledovaného analytu ve vzorku, v y z n a č e n ý t í m , že zahrnuje:

(a) kontaktování vzorku s povrchem podložky, který obsahuje množinu diskrétních vazebných domén, které jsou prostorově zarovnány s množinou elektrodových a protielektrodových párů a mohou být k této množině přiblíženy, přičemž uvedený vzorek obsahuje sledovaný analyt, navázaný na elektrochemiluminescenční označení, a

kontaktování se provádí za podmínek, při kterých může navázání libovolného analytu ve vzorku na uvedené vazebné domény proběhnout;

(b) uvedení druhého vzorku do kontaktu s vazebnými doménami za podmínek, při kterých může navázání uvedeného analytu ve vzorku na uvedené vazebné domény proběhnout, přičemž na žádném z uvedených analytů druhého vzorku není navázáno elektrochemiluminescenční označení;

(c) umístění uvedených vazebných domén do blízkosti množiny elektrodových a protielektrodových párů;

(d) aplikaci napěťové vlny, účinné pro spuštění elektrochemiluminescence; a

(e) detekci a měření elektrochemiluminescence, přičemž snížení elektrochemiluminescence v porovnání s elektrochemiluminescencí pozorovanou v případě, že se vynechá krok (b) nebo se provede v nepřítomnosti sledovaného analytu v druhém vzorku, naznačuje přítomnost určitého množství uvedeného analytu ve vzorku.

136. Způsob podle nároku 131, v y z n a č e n ý t í m , že se vzorek odebere savcí a uvedený způsob se použije ke stanovení nebo potvrzení identity savce.

137. Způsob podle nároku 131, v y z n a č e n ý t í m , že vzorek obsahuje savčí buňky a způsob se použije pro určení počtu buněk v uvedeném vzorku.

138. Způsob provádění sledované reakce, v y z n a - č e n ý t í m , že zahrnuje:

(a) aplikaci vzorku na každou z množiny diskrétních domén na povrchu první podložky, přičemž každá z uvedených domén je hydrofilní a obklopená hydrofobní oblastí na uvedeném prvním nosném povrchu; a

(b) situování druhé podložky, která má na svém povrchu množinu vazebných diskrétních domén, z nichž každá (i) je hydrofilní a obklopena hydrofobní oblastí na uvedeném druhém povrchu, (ii) obsahuje reakční médium, vhodné pro provádění sledované reakce, a (iii) je prostorově zarovnána s doménou na povrchu uvedené první podložky, při kterém se každá z uvedených domén na povrchu druhé podložky ocitne v kontaktu s doménou na povrchu první podložky, se kterou je zarovnána a vzorek se dostane do kontaktu s reakčním médiem.

139. Způsob podle nároku 109, v y z n a č e n ý t í m , že se uvedená množina kapalných vzorků aplikuje na uvedenou monovrstvu současně.

140. Způsob podle nároku 110, v y z n a č e n ý t í m , že uvedená podložka obsahuje elastomerní materiál.

141. Způsob podle nároku 119, v y z n a č e n ý t í m , že uvedená strukturovaná, samočinně sestavená monovrstva obsahuje alkanthioly.

142. Způsob detekce nebo měření sledovaného analytu ve vzorku, v y z n a č e n ý t í m , že zahrnuje:

(a) uvedení jedné nebo více domén z množiny diskrétních vazebných domén, která se nachází na povrchu jedné nebo několika podložek, do styku se vzorkem, obsahujícím molekuly, které jsou navázány na elektrochemiluminescenční označení, přičemž uvedený vzorek v průběhu kontaktního kroku nekontaktuje žádnou elektrodu, ani protielektrodu;

(b) umístění elektrody do blízkosti množiny uvedené jedné nebo několika domén z množiny vazebných domén;

(c) aplikaci napěťové vlny, účinné pro spuštění elektrochemiluminescence na jednu nebo několik domén z množiny vazebných domén; a

(d) detekci a měření elektrochemiluminescence.

143. Způsob detekce nebo měření sledovaného analytu ve vzorku, v y z n a č e n ý t í m , že zahrnuje:

(a) uvedení jedné nebo více domén z množiny diskrétních vazebných domén, (i) která se nachází na povrchu jedné nebo několika podložek a (ii) které jsou vzájemně prostorově zarovnané s množinou elektrodových a protielektrodových párů a nacházejí se v její blízkosti, do styku se vzorkem obsahujícím molekuly, které jsou navázány na elektrochemiluminescenční označení;

(b) umístění elektrody a protielektrody do blízkosti množiny uvedené jedné nebo několika domén z množiny vazebných domén;

(c) aplikaci napěťové vlny, účinné pro spuštění elektrochemiluminescence na jednu nebo několik domén z množiny vazebných domén; a

(d) detekci a měření elektrochemiluminescence.

144. Kazeta, v y z n a č e n á t í m , že obsahuje:

(a) elektrodu, obsahující na svém povrchu předem stanovené množství materiálu, který obsahuje vazebná reakční činidla, organizovaná v jedné nebo více diskrétních vazebných doménách, přičemž uvedená vazebná reakční činidla jsou schopna specificky vázat elektrochemiluminescenčně značené molekuly nebo vazebného partnera elektrochemiluminescenčně značené molekuly a uvedený materiál (i) umožňuje elektronový přenos mezi uvedenou elektrodou a elektrochemiluminescenčním značením v uvedené elektrochemiluminescenčně značené molekule, navázané na uvedenou vazebnou reakční činidlo nebo uvedeného vazebného partnera, pokud je tento vazebný partner navázán na uvedenou vazebnou reakční činidlo, nebo (ii) umožňuje uvedenou elektrodu generovat fotony z elektrochemiluminescenčního označení; a

(b) protielektrodu.

145. Kazeta, v y z n a č e n á t í m , že obsahuje elektrodu, obsahující na svém povrchu předem stanovené množství materiálu, který obsahuje vazebná reakční činidla, organizovaná v jedné nebo více diskrétních vazebných doménách, přičemž uvedená vazebná reakční činidla jsou elektrochemiluminescenčně značena a uvedený materiál

17.07.98

207

umožňuje elektronový přenos mezi elektrodou a elektrochemiluminescenčním značením.

146. Kazeta podle nároku 143, v y z n a č e n á t í m , že uvedená elektroda je porézní.

147. Kazeta podle nároku 144, v y z n a č e n á t í m , že uvedená elektroda je porézní.

148. Kazeta, v y z n a č e n á t í m , že obsahuje:

(a) podložku, která má jednu nebo více diskrétních vazebných domén, obsahujících vazebná reakční činidla;

(b) iontově propustnou porézní matrici, přičemž uvedená vazebná doména je navázána na uvedenou porézní matrici;

(c) elektrodu v elektrochemickém kontaktu s uvedenou vazebnou doménou; a

(d) protielektrodu.

149. Kazeta podle nároku 147, v y z n a č e n á t í m , že vazebná reakční činidla jsou elektrochemiluminescenčně značena.

150. Kazeta, v y z n a č e n á t í m , že obsahuje:

17.07.98

(a) vazebnou doménu, obsahující vazebná reakční činidla; a

(b) porézní podložku, přičemž uvedená vazebná doména je navázána na uvedené porézní podložce, která tvoří elektrodu, nacházející se v elektrochemickém kontaktu s uvedenou vazebnou doménou.

151. Kazeta podle nároku 149, v y z n a č e n á t í m , že dále obsahuje protielektrodu.

152. Kazeta podle nároku 150, v y z n a č e n á t í m , že uvedená vazebná činidla jsou kovalentně navázána na elektrodě.

153. Kazeta, v y z n a č e n á t í m , že obsahuje:

(a) první podložku, mající první povrch, který obsahuje elektrodu; a

(b) druhou podložku, mající druhý povrch obsahující vazebnou doménu, přičemž uvedený první a druhý povrch jsou prostorově zarovnané a tvoří elektrochemický kontakt.

154. Sada, v y z n a č e n á t í m , že obsahuje:

(a) první podložku, mající první povrch, který obsahuje elektrodu;

(b) druhou podložku, mající druhý povrch obsahující vazebnou doménu, která obsahuje předem stanovené množství

vazebných reakčních činidel, přičemž uvedený první a druhý povrch jsou prostorově zarovnány a tvoří elektrochemický kontakt; a

(c) lahvičku, obsahující elektrochemiluminescenčně značené druhy.

155. Kazeta, v y z n a č e n á t í m , že obsahuje:

(a) první podložku, mající první povrch, který obsahuje elektrodu; a

(b) druhou podložku, mající druhý povrch, obsahující jednu nebo několik vazebných domén, přičemž uvedený první a druhý povrch jsou prostorově zarovnány a umožňují elektronový přenos mezi elektrochemiluminescenčním označením souvisejícím s vazebnou doménou a elektrodou.

156. Kazeta podle nároku 154, v y z n a č e n á t í m , že druhý povrch je tvořen porézním materiálem a kazeta dále obsahuje protielektrodu.

157. Kazeta, v y z n a č e n á t í m , že obsahuje:

(a) elektrodu, mající první povrch;

(b) protielektrodu, mající druhý povrch; a

(c) porézní materiál, který je uspořádán mezi uvedeným prvním a druhým povrchem a který obsahuje vazebná reakční činidla, schopná vázat elektrochemiluminescenčně značenou molekulu, přičemž uvedený porézní materiál a uvedený první povrch jsou prostorově vzájemně zarovnány tak, že umožňují

elektronový přenos mezi elektrochemiluminescenčním označením na molekule, navázané na jedno nebo několik vazebných reakčních činidel, a uvedeným prvním povrchem.

158. Kazeta, v y z n a č e n á t í m , že obsahuje:

(a) porézní elektrodu;

(b) protielektrodu;

(c) podložku, mající na sobě množinu diskrétních vazebných domén, které jsou prostorově vzájemně zarovnány tak, že umožňují elektronový přenos mezi elektrochemiluminescenčně značenými druhy, navázanými na vazebnou doménu a uvedenou porézní elektrodou.

159. Kazeta, v y z n a č e n á t í m , že obsahuje:

(a) porézní elektrodu; a

(b) protielektrodu, přičemž uvedená porézní elektroda má na svém povrchu materiál, který obsahuje vazebná reakční činidla, přičemž uvedený materiál umožňuje elektronový přenos mezi uvedenou elektrodou a elektrochemiluminescenčním označením, navázaným na jednom nebo více vazebných reakčních činidlech.

160. Kazeta, v y z n a č e n á t í m , že obsahuje:

(a) podložku, mající na sobě množinu diskrétních vazebných domén;

(b) komoru pro dopravu kapaliny směrem k uvedeným vazebným doménám a zpět; a

(c) elektrodu a protielektrodu vzájemně prostorově zarovnané tak, že generují elektrochemiluminescenční signál z elektrochemiluminescenčního značení, navázaného na uvedenou množinu vazebných domén.

161. Kazeta, v y z n a č e n á t í m , že obsahuje:

(a) elektrodu, obsahující na svém povrchu množinu diskretních vazebných domén; a

(b) protielektrodu.

162. Kazeta, v y z n a č e n á t í m , že obsahuje:

(a) množinu diskretních vazebných domén na podložce;

(b) elektrodu; a

(c) protielektrodu, přičemž uvedená elektroda je schopna generovat množinu elektrochemiluminescenčních signálů z množiny elektrochemiluminescenčních označení navázaných na množině diskretních vazebných domén.

163. Kazeta podle nároku 161, v y z n a č e n á t í m , že množina vazebných domén obsahuje elektrochemiluminescenční označení a kazeta dále obsahuje prostředek pro dodávku vzorku na množinu diskretních vazebných domén.

164. Kazeta podle nároku 161, v y z n a č e n á t í m , že dále obsahuje prostředek pro dodávku vzorku na množinu diskretních vazebných domén.

165. Kazeta podle nároku 160, v y z n a č e n á t í m , že uvedená elektroda je schopna generovat množinu elektrochemiluminescenčních signálů z množiny elektrochemiluminescenčních označení, souvisejících s alespoň jednou z množiny vazebných domén.

166. Kazeta, v y z n a č e n á t í m , že obsahuje:

(a) podložku, mající na sobě množinu diskretních vazebných domén; a

(b) jeden nebo více elektrodových a protielektrodových párů.

167. Kazeta podle nároku 165, v y z n a č e n á t í m , že dále obsahuje prostředek pro dodávku vzorku na množinu diskretních vazebných domén.

168. Sada, v y z n a č e n á t í m , že obsahuje:

(a) elektrodu, obsahující na svém povrchu diskretní vazebné domény organizované do vzoru;

(b) komoru pro dopravu kapaliny k uvedeným vazebným doménám a zpět;

(c) protielektrodu; a

17.07.98

213

(d) lahvičku, obsahující elektrochemiluminescenčně značené molekuly.

169. Kazeta, v y z n a č e n á t í m , že obsahuje:

(a) množinu diskretních vazebných domén, navázaných na elektrodě, přičemž uvedená elektroda se nachází v blízkosti iontově propustné porézní matrice; a

(b) protielektrodu.

170. Kazeta, v y z n a č e n á t í m , že obsahuje:

(a) množinu diskretních vazebných domén, navázaných na iontově propustné porézní matrici;

(b) elektrodu, která se nachází v blízkosti uvedené iontově propustné porézní matrice; a

(c) protielektrodu.

171. Kazeta, v y z n a č e n á t í m , že obsahuje:

(a) množinu diskretních vazebných domén, navázaných na iontově propustné porézní matrici; a

(b) elektrodu, která je v elektrochemickém kontaktu s množinou uvedených vazebných domén.

172. Kazeta podle nároku 170, v y z n a č e n á t í m , že dále obsahuje protielektrodu.

173. Kazeta, v y z n a č e n á t í m , že obsahuje:

(a) množinu diskrétních vazebných domén, navázaných na porézní matrici; a

(b) elektrodu, která je v elektrochemickém kontaktu s množinou uvedených vazebných domén.

174. Kazeta, v y z n a č e n á t í m , že obsahuje:

(a) elektrochemický článek, obsahující elektrodu, protielektrodu a iontový roztok, který kontaktuje uvedenou elektrodu; a

(b) podložku, mající na sobě množinu diskrétních vazebných domén, které jsou v elektrochemickém kontaktu s uvedenou elektrodou.

175. Kazeta podle nároku 143, 144 nebo 160, v y z n a č e n á t í m , že elektroda obsahuje uhlíkové fibrily.

176. Způsob detekce nebo měření elektrochemiluminescence, v y z n a č e n ý t í m , že zahrnuje:

(a) kontaktování vazebných reakčních činidel v kazetě, podle nároku 143, se vzorkem obsahujícím molekuly, které jsou navázány na elektrochemiluminescenční označení;

(b) aplikaci napětové vlny, účinné pro spuštění elektrochemiluminescence na uvedené elektrodě a proti-elektrodě; a

(c) detekci nebo měření elektrochemiluminescence.

177. Způsob detekce nebo měření elektrochemiluminescence, v y z n a č e n ý t í m , že zahrnuje:

(a) kontaktování vazebných reakčních činidel v kazetě, podle nároku 144, se vzorkem obsahujícím molekuly, které jsou navázány na elektrochemiluminescenční označení;

(b) aplikaci napětové vlny, účinné pro spuštění elektrochemiluminescence na uvedené elektrodě a proti-elektrodě; a

(c) detekci nebo měření elektrochemiluminescence.

178. Způsob podle nároku 175, v y z n a č e n ý t í m , že uvedená elektroda je porézní.

179. Způsob detekce nebo měření elektrochemiluminescence, v y z n a č e n ý t í m , že zahrnuje:

(a) kontaktování vazebných reakčních činidel v kazetě, podle nároku 147, se vzorkem obsahujícím molekuly, které jsou navázány na elektrochemiluminescenční označení;

(b) aplikaci napětové vlny, účinné pro spuštění elektrochemiluminescence na uvedené elektrodě a proti-elektrodě; a

(c) detekci nebo měření elektrochemiluminescence.

180. Způsob detekce nebo měření elektrochemiluminescence, v y z n a č e n ý t í m , že zahrnuje:

(a) kontaktování vazebných reakčních činidel v kazetě, podle nároku 150, se vzorkem obsahujícím molekuly, které jsou navázány na elektrochemiluminescenční označení;

(b) aplikaci napěťové vlny, účinné pro spuštění elektrochemiluminescence na uvedené elektrodě a proti-elektrodě; a

(c) detekci nebo měření elektrochemiluminescence.

181. Způsob detekce nebo měření elektrochemiluminescence, v y z n a č e n ý t í m , že zahrnuje:

(a) kontaktování vazebných reakčních domén, které se nacházejí na prvním povrchu se vzorkem obsahujícím molekuly, navázané na elektrochemiluminescenční označení, přičemž uvedený první povrch je vzájemně zarovnán s druhým povrchem obsahujícím elektrodu a uvedený první a druhý povrch jsou vzájemně prostorově zarovnány a tvoří elektrochemický kontakt;

(b) aplikaci napěťové vlny, účinné pro spuštění elektrochemiluminescence na uvedené elektrodě a proti-elektrodě; a

(c) detekci nebo měření elektrochemiluminescence.

182. Způsob podle nároku 180, v y z n a č e n ý t í m , že první povrch je tvořen porézním materiálem.

183. Způsob detekce nebo měření elektrochemiluminescence, v y z n a č e n ý t í m , že zahrnuje:

(a) kontaktování vazebných reakčních činidel v kazetě, podle nároku 156, se vzorkem obsahujícím molekuly, které jsou navázány na elektrochemiluminescenční označení;

(b) aplikaci napětové vlny, účinné pro spuštění elektrochemiluminescence na uvedeném prvním povrchu a uvedeném druhém povrchu; a

(c) detekci nebo měření elektrochemiluminescence.

184. Způsob detekce nebo měření elektrochemiluminescence, v y z n a č e n ý t í m , že zahrnuje:

(a) kontaktování vazebných domén v kazetě, podle nároku 157, se vzorkem obsahujícím molekuly, které jsou navázány na elektrochemiluminescenční označení;

(b) aplikaci napětové vlny, účinné pro spuštění elektrochemiluminescence na uvedené elektrodě a proti-elektrodě; a

(c) detekci nebo měření elektrochemiluminescence.

185. Způsob detekce nebo měření elektrochemiluminescence, v y z n a č e n ý t í m , že zahrnuje:

(a) kontaktování vazebných reakčních činidel v kazetě, podle nároku 158, se vzorkem obsahujícím molekuly, které jsou navázány na elektrochemiluminescenční označení;

(b) aplikaci napětové vlny, účinné pro spuštění elektrochemiluminescence na uvedené elektrodě a proti-elektrodě; a

(c) detekci nebo měření elektrochemiluminescence.

186. Způsob detekce nebo měření elektrochemiluminescence, v y z n a č e n ý t í m , že zahrnuje:

(a) kontaktování vazebných domén v kazetě, podle nároku 159, se vzorkem obsahujícím molekuly, které jsou navázány na elektrochemiluminescenční označení;

(b) aplikaci napětové vlny, účinné pro spuštění elektrochemiluminescence na povrchu uvedené elektrody a protielektrody; a

(c) detekci nebo měření elektrochemiluminescence.

187. Způsob detekce nebo měření elektrochemiluminescence, v y z n a č e n ý t í m , že zahrnuje:

(a) kontaktování vazebných domén v kazetě, podle nároku 160, se vzorkem obsahujícím molekuly, které jsou navázány na elektrochemiluminescenční označení;

(b) aplikaci napětové vlny, účinné pro spuštění elektrochemiluminescence na uvedené elektrodě a proti-elektrodě; a

(c) detekci nebo měření elektrochemiluminescence.

188. Způsob detekce nebo měření elektrochemiluminescence, ~~v y z n a č e n ý t í m , že zahrnuje:~~

(a) kontaktování vazebných domén v kazetě, podle nároku 161, se vzorkem obsahujícím molekuly, které jsou navázány na elektrochemiluminescenční označení;

(b) aplikaci napětové vlny, účinné pro spuštění elektrochemiluminescence na uvedené elektrodě a proti-elektrodě; a

(c) detekci nebo měření elektrochemiluminescence.

189. Způsob detekce nebo měření elektrochemiluminescence, v y z n a č e n ý t í m , že zahrnuje:

(a) kontaktování množiny diskrétních vazebných domén na povrchu se vzorkem obsahujícím molekuly, které jsou navázány na elektrochemiluminescenční označení aplikováním vzorku obsahujícího uvedenou molekulu na uvedenou vazebnou doménu, přičemž uvedený vzorek je schopen modulovat elektrochemiluminescenční signály a tato modulace je korelovatelná s koncentrací sledovaného analytu ve vzorku;

(b) aplikaci napěťové vlny, účinné pro spuštění elektrochemiluminescence na uvedenou elektrodu a proti-elektrodu z elektrochemiluminescenčního označení navázaného na molekule, navázané na alespoň jedné z uvedených vazebných domén;

(c) měření elektrochemiluminescence; a

(d) určení koncentrace sledovaného analytu.

190. Způsob detekce nebo měření elektrochemiluminescence, v y z n a č e n ý t í m , že zahrnuje:

(a) kontaktování vazebných reakčních činidel v kazetě, podle nároku 143, se vzorkem obsahujícím první molekulu a druhou molekulu, které jsou navázány na elektrochemiluminescenční označení, přičemž druhá molekula je specifickým vazebným partnerem první molekuly;

(b) aplikaci napěťové vlny, účinné pro spuštění elektrochemiluminescence na uvedenou elektrodu a proti-elektrodu; a

(c) detekci nebo měření elektrochemiluminescence.

191. Způsob detekce nebo měření elektrochemiluminescence, v y z n a č e n ý t í m , že zahrnuje:

(a) kontaktování vazebných domén v kazetě, podle nároku 165, se vzorkem obsahujícím molekuly, které jsou navázány na elektrochemiluminescenční označení;

(b) aplikaci napětové vlny, účinné pro spuštění elektrochemiluminescence na alespoň jednom z uvedených elektrodových a protielektrodových párů; a

(c) detekci nebo měření elektrochemiluminescence.

192. Způsob detekce nebo měření elektrochemiluminescence, v y z n a č e n ý t í m , že zahrnuje:

(a) kontaktování vazebných domén v kazetě, podle nároku 168, se vzorkem obsahujícím molekuly, které jsou navázány na elektrochemiluminescenční označení;

(b) aplikaci napětové vlny, účinné pro spuštění elektrochemiluminescence na elektrodě a protielektrodě; a

(c) detekci nebo měření elektrochemiluminescence.

193. Způsob detekce nebo měření elektrochemiluminescence, v y z n a č e n ý t í m , že zahrnuje:

~~(a) kontaktování vazebných domén v kazetě,~~ podle nároku 169, se vzorkem obsahujícím molekuly, které jsou navázány na elektrochemiluminescenční označení;

(b) aplikaci napětové vlny, účinné pro spuštění elektrochemiluminescence na elektrodě a protielektrodě; a

(c) detekci nebo měření elektrochemiluminescence.

194. Způsob detekce nebo měření elektrochemiluminescence, v y z n a č e n ý t í m , že zahrnuje:

(a) kontaktování vazebných domén v kazetě, podle nároku 171, se vzorkem obsahujícím molekuly, které jsou navázány na elektrochemiluminescenční označení;

(b) aplikaci napětové vlny, účinné pro spuštění elektrochemiluminescence na elektrodě a protielektrodě; a

(c) detekci nebo měření elektrochemiluminescence.

195. Způsob detekce nebo měření elektrochemiluminescence, v y z n a č e n ý t í m , že zahrnuje:

(a) kontaktování vazebných domén v kazetě, podle nároku 173, se vzorkem obsahujícím molekuly, které jsou navázány na elektrochemiluminescenční označení;

(b) aplikaci napětové vlny, účinné pro spuštění elektrochemiluminescence na elektrodě a protielektrodě; a

(c) detekci nebo měření elektrochemiluminescence.

196. Způsob podle nároku 175, 188 nebo 189, v y z n a č e n ý t í m , že elektroda obsahuje uhlíkové fibrily.

197. Způsob provádění množiny elektrochemiluminescenčních testů, v y z n a č e n ý t í m , že zahrnuje:

(a) uvedení množiny diskrétních polymerních matric, z nichž každá obsahuje jednu nebo několik vazebných domén, do

kontaktu se vzorkem, obsahujícím jeden sledovaný analyt nebo množinu sledovaných analytů;

(b) vyvolání elektrochemiluminescence na jedné nebo více doménách z uvedené množiny domén; a

(c) detekci elektrochemiluminescence.

198. Způsob podle nároku 197, v y z n a č e n ý t í m , že elektrochemiluminescence se detekuje pomocí fotografického filmu.

199. Způsob provádění množiny elektrochemiluminescenčních testů, v y z n a č e n ý t í m , že zahrnuje:

(a) uvedení množiny vazebných domén, obsahujících oligonukleové kyseliny, do kontaktu se vzorkem, obsahujícím jeden sledovaný analyt nebo množinu sledovaných analytů;

(b) vyvolání elektrochemiluminescence na jedné nebo více doménách z uvedené množiny domén; a

(c) detekci elektrochemiluminescence na množině vazebných domén.

200. Způsob podle nároku 199, v y z n a č e n ý t í m , že uvedená množina vazebných domén obsahuje oligonukleové kyseliny, navázané na elektrochemiluminescenční označení.

201. Způsob podle nároku 199, v y z n a č e n ý t í m , že uvedená množina vazebných domén obsahuje oligonukleové kyseliny, navázané na elektrochemiluminescenční označení a jeden nebo více uvedených analytů, které, pokud jsou navázány na uvedené oligonukleové kyseliny, způsobí modulaci elektrochemiluminescenčního signálu z jedné nebo více vazebných domén.

202. Způsob provádění množiny elektrochemiluminescenčních testů, jehož součástí je detekce množiny analytů, přítomných ve vícesložkovém vzorku v koncentraci přibližně nižší než 10^{-3} , v y z n a č e n ý t í m , že zahrnuje:

(a) kontaktování množiny diskrétních vazebných domén se vzorkem, obsahujícím jeden sledovaný analyt nebo množinu sledovaných analytů;

(b) vyvolání elektrochemiluminescence jedné nebo více domén z množiny vazebných domén; a

(c) detekci elektrochemiluminescence na množině uvedených vazebných domén.

203. Systém pro provádění množiny elektrochemiluminescenčních testů, v y z n a č e n ý t í m , že obsahuje:

(a) množinu vazebných domén, specifických pro množinu různých analytů;

(b) generátor napěťových vln; a

(c) fotonový detekční prostředek.

17.07.98

224

204. Systém pro provádění množiny elektrochemiluminescenčních testů, v y z n a č e n ý t í m , že obsahuje:

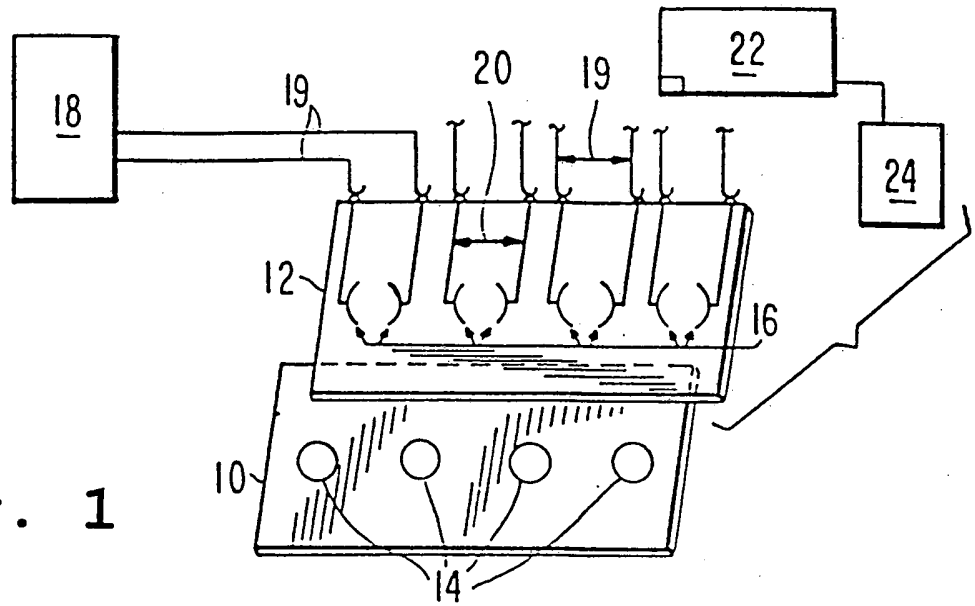
- (a) elektrodu;
- (b) protielektrodu;
- (c) množinu vazebných domén, specifických pro množinu různých analytů;
- (d) prostředek pro spouštění elektrochemiluminescence;
- a
- (e) prostředek pro detekci elektrochemiluminescence.

~~Zastupuje:~~

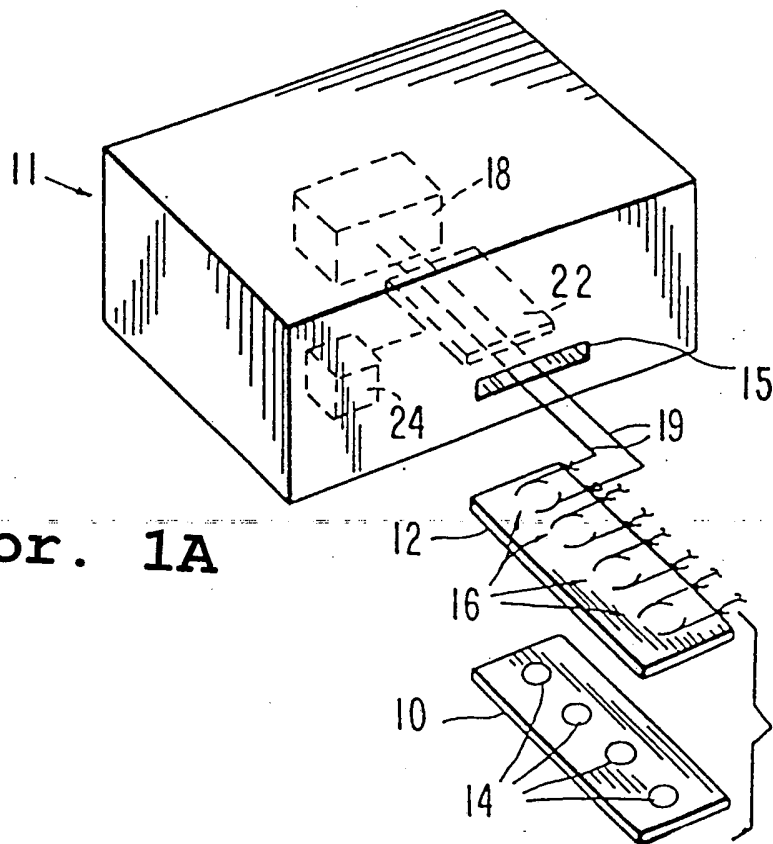
17.07.98

DV 2844-97

1/26



Obr. 1



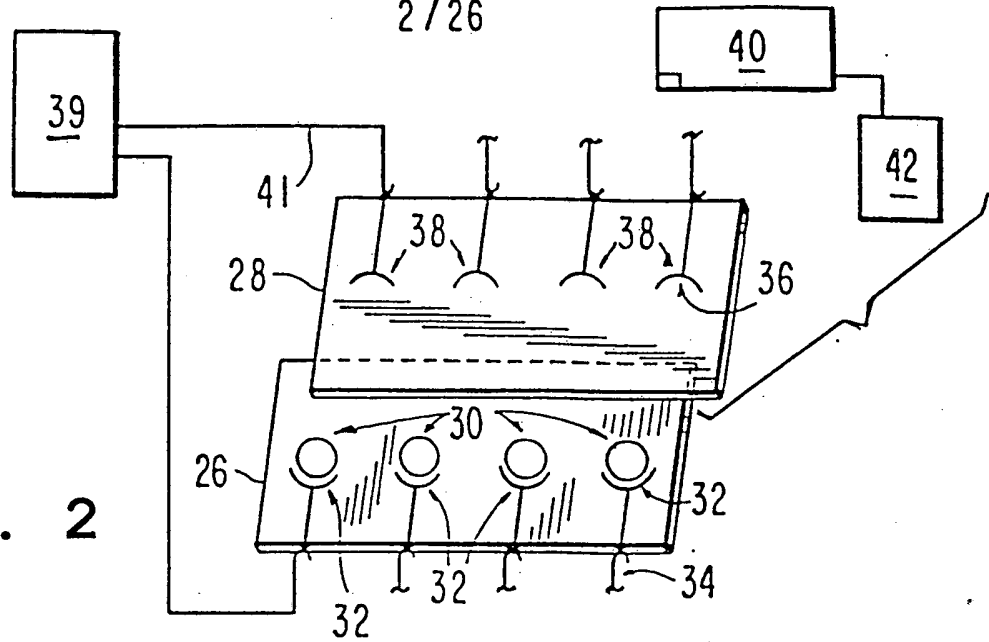
Obr. 1A

17.07.98

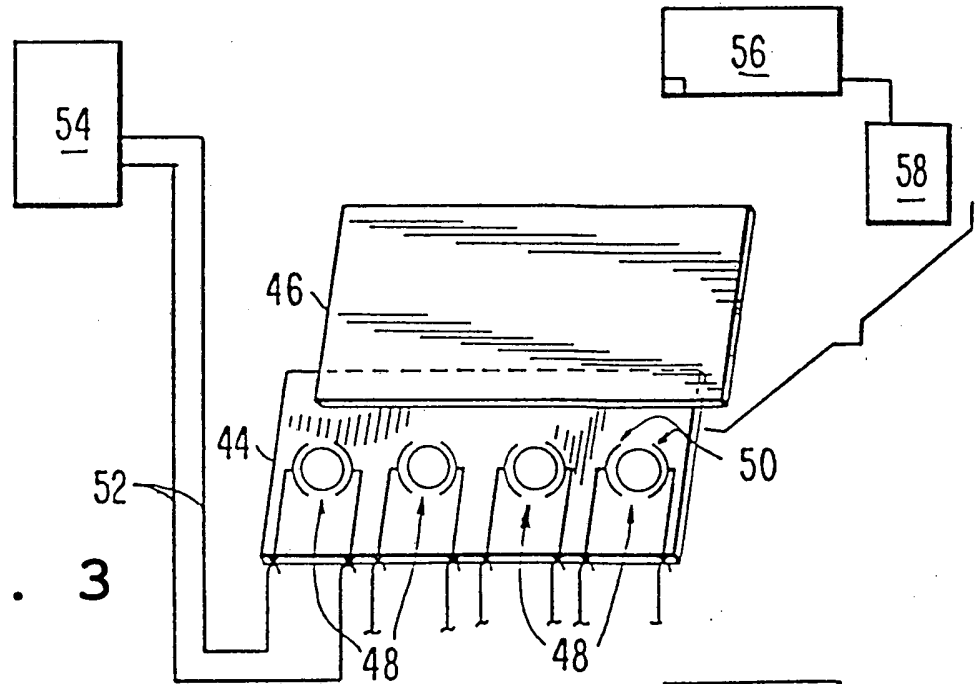
2844-97

2/26

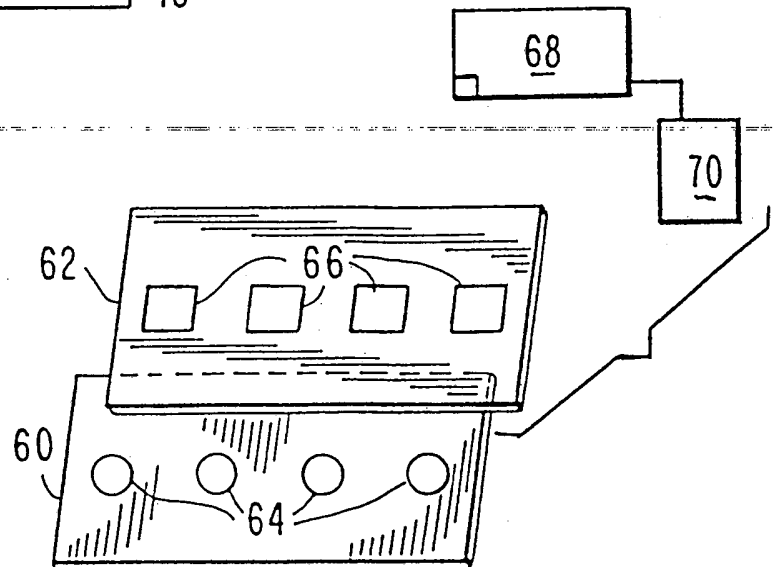
Obr. 2



Obr. 3



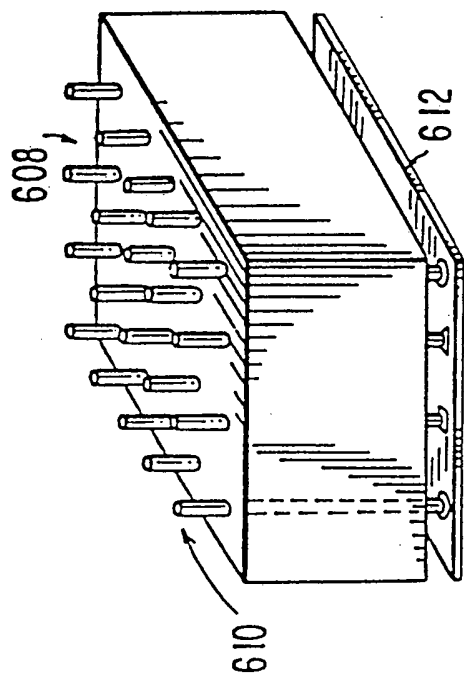
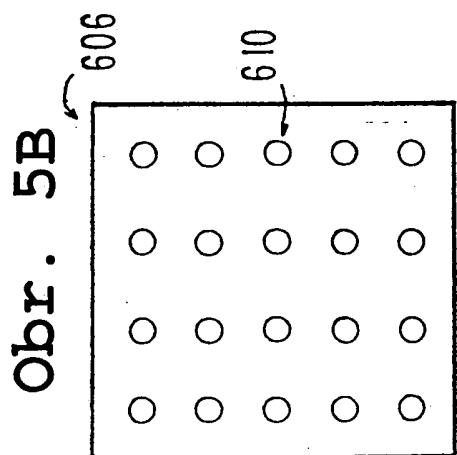
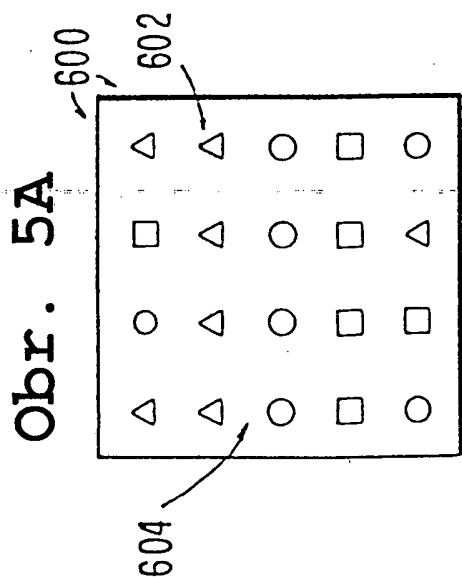
Obr. 4



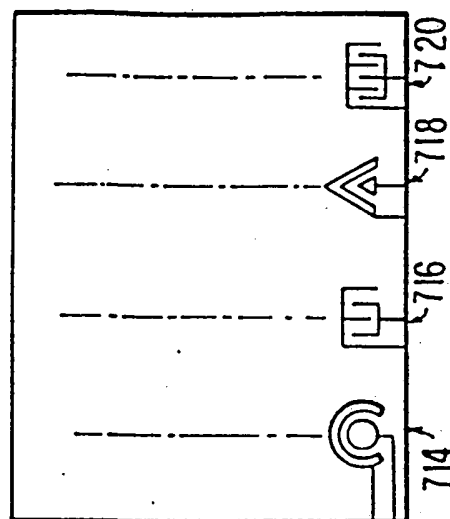
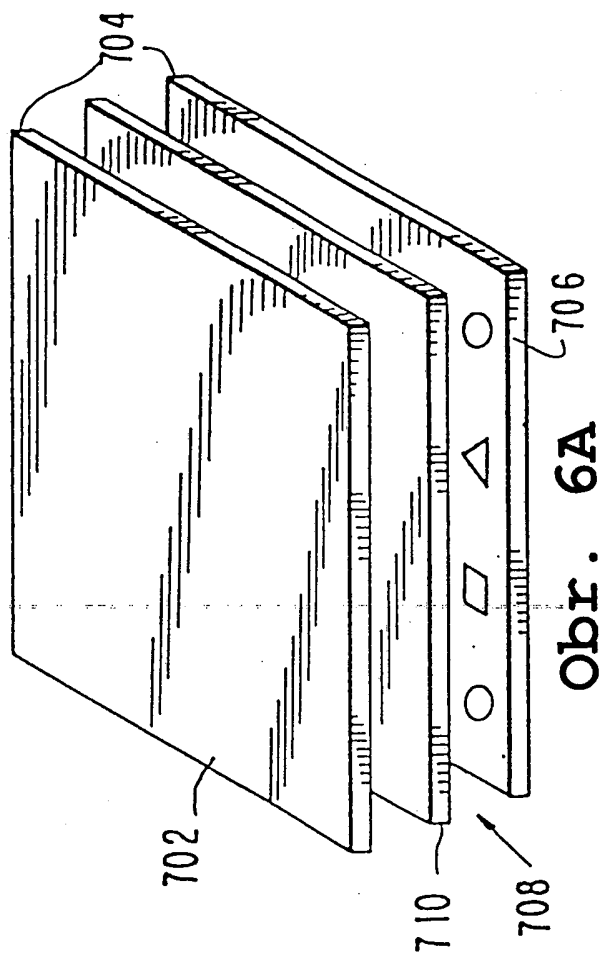
17.07.98

2844-98

3/26

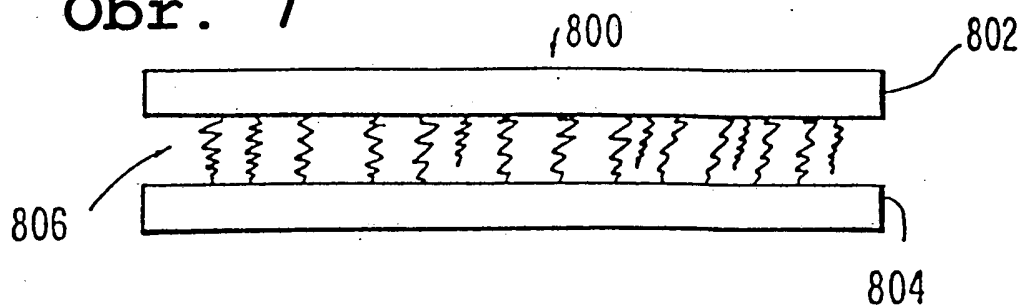


Obr. 5C

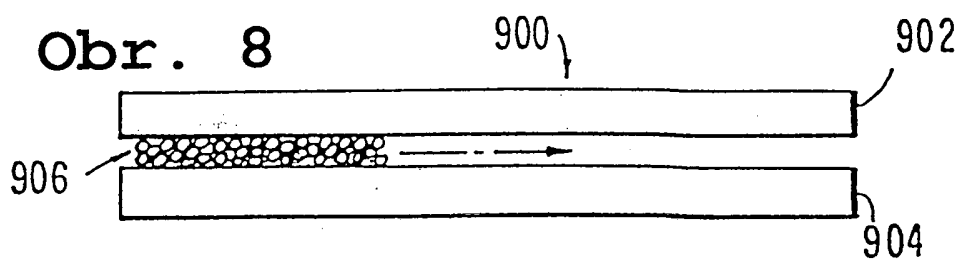


Obr. 6B

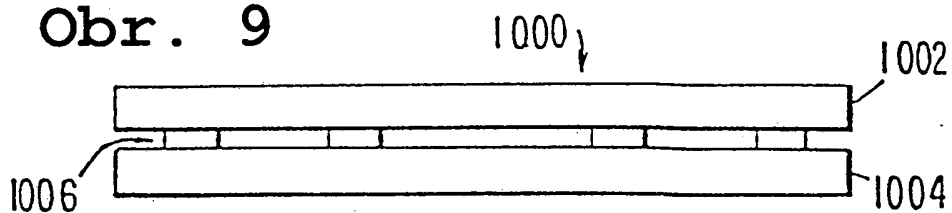
Obr. 7



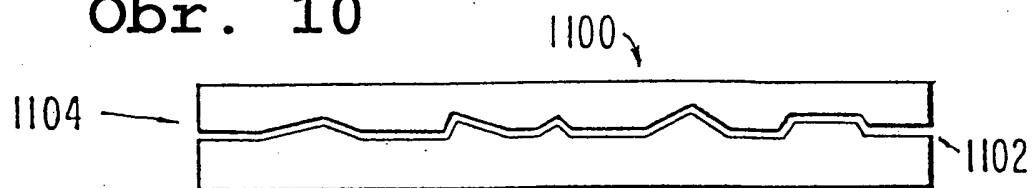
Obr. 8



Obr. 9



Obr. 10

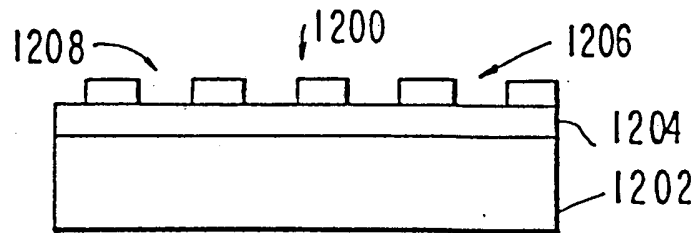


17.07.98

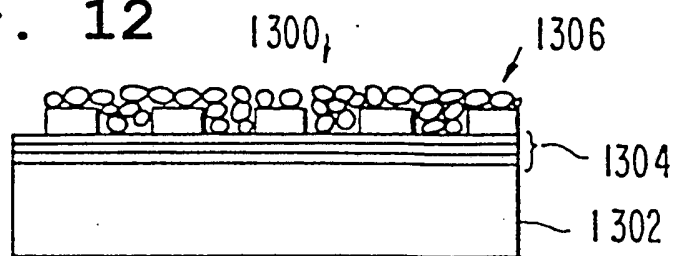
2844-97

5/26

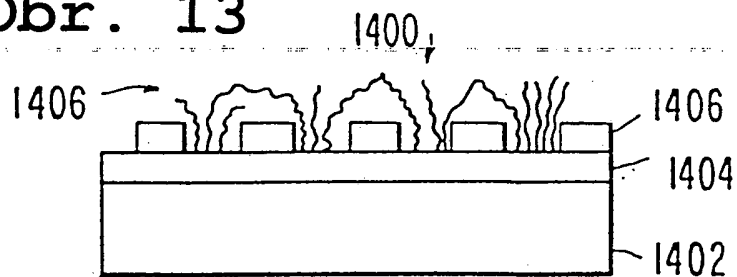
Obr. 11



Obr. 12



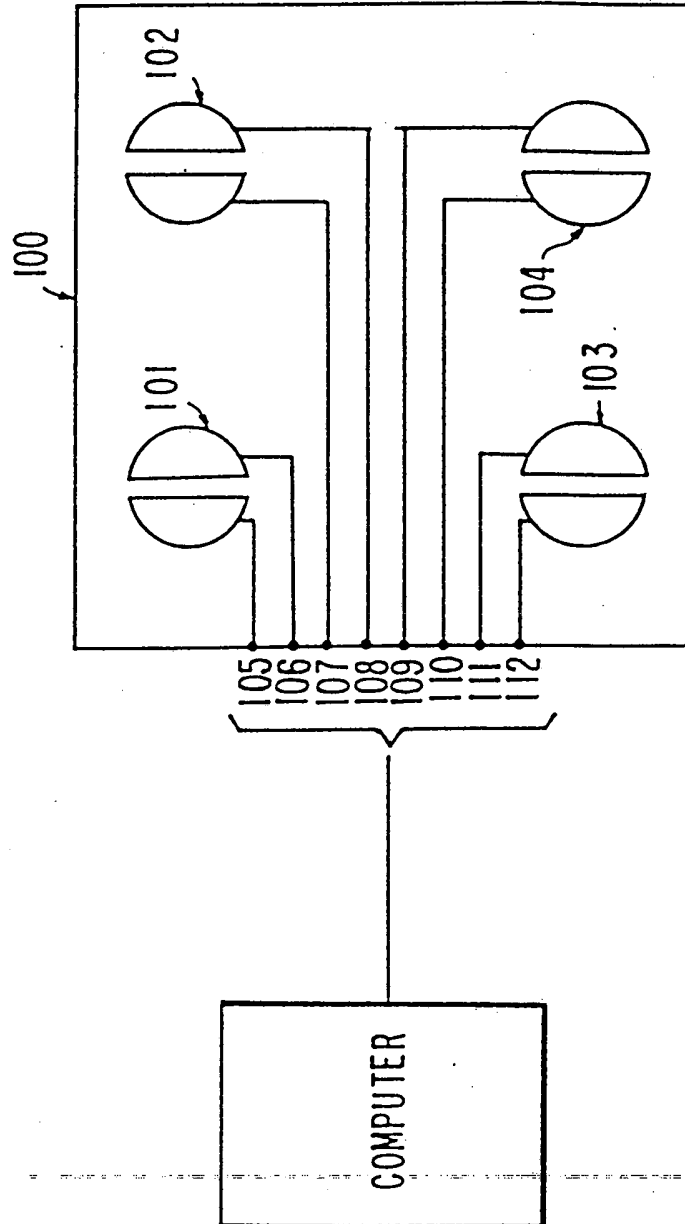
Obr. 13



17.07.98

2844-97

6/26

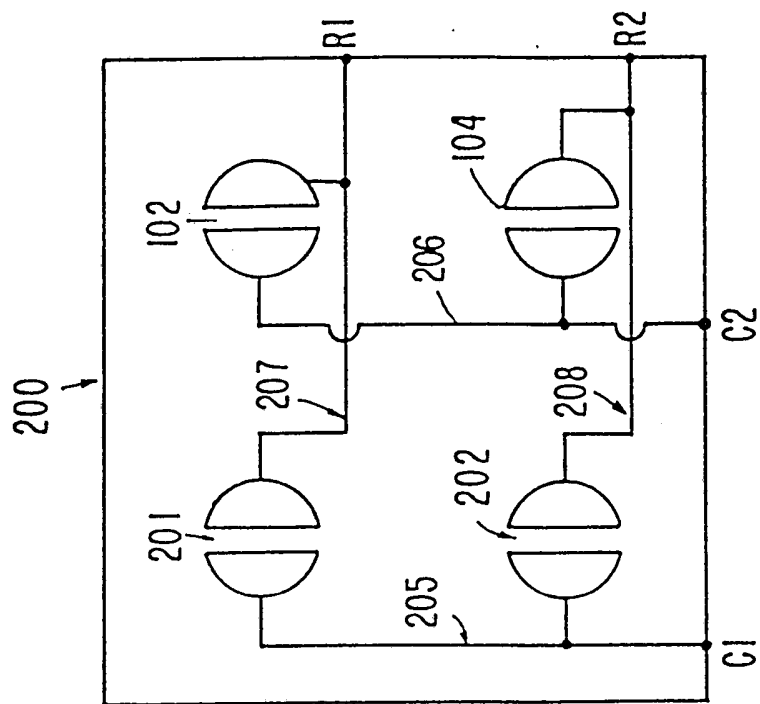


Obr. 14

17.07.98

2844-97

7 / 26

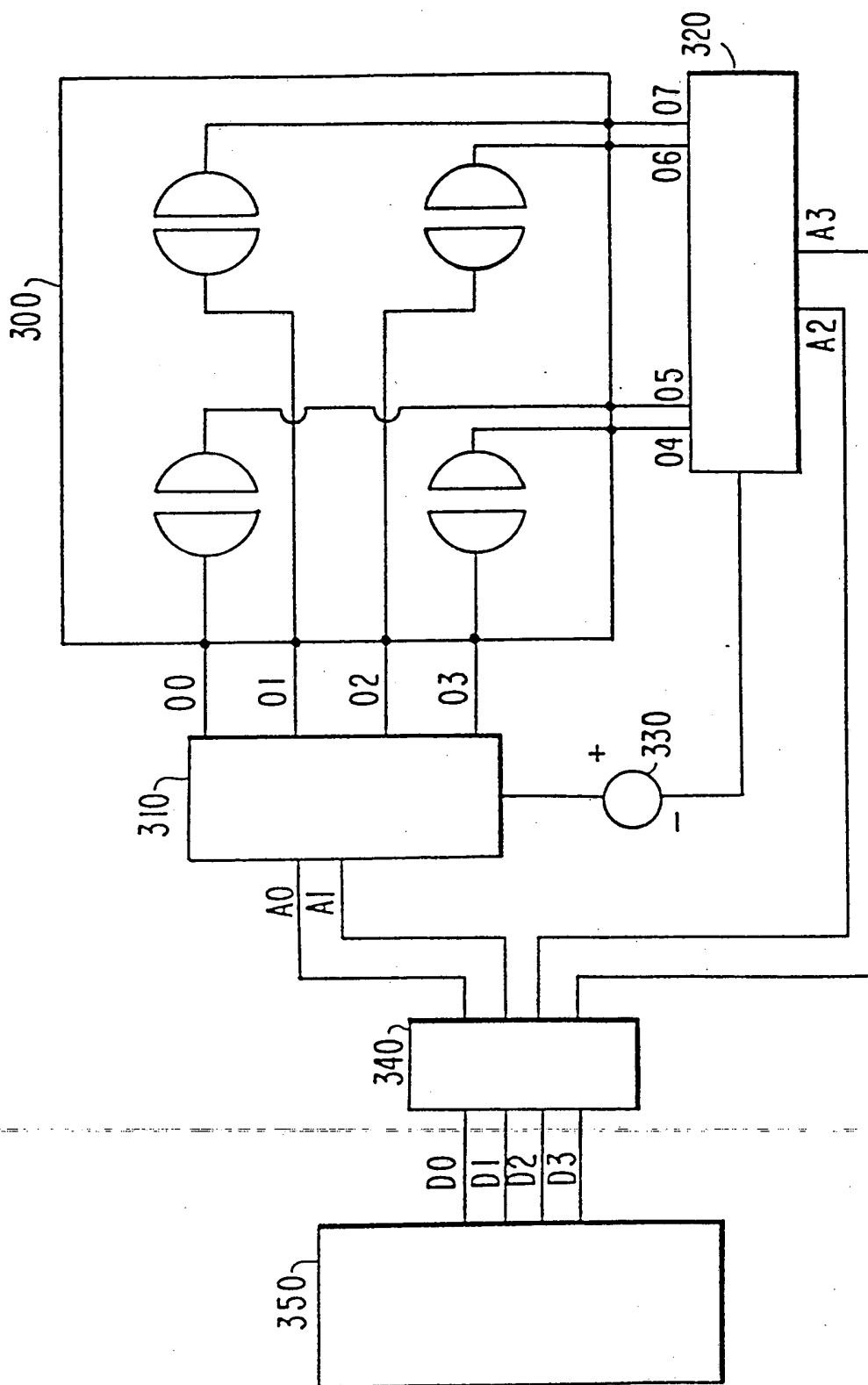


Obr. 15

17.07.98

2844-97

8 / 26

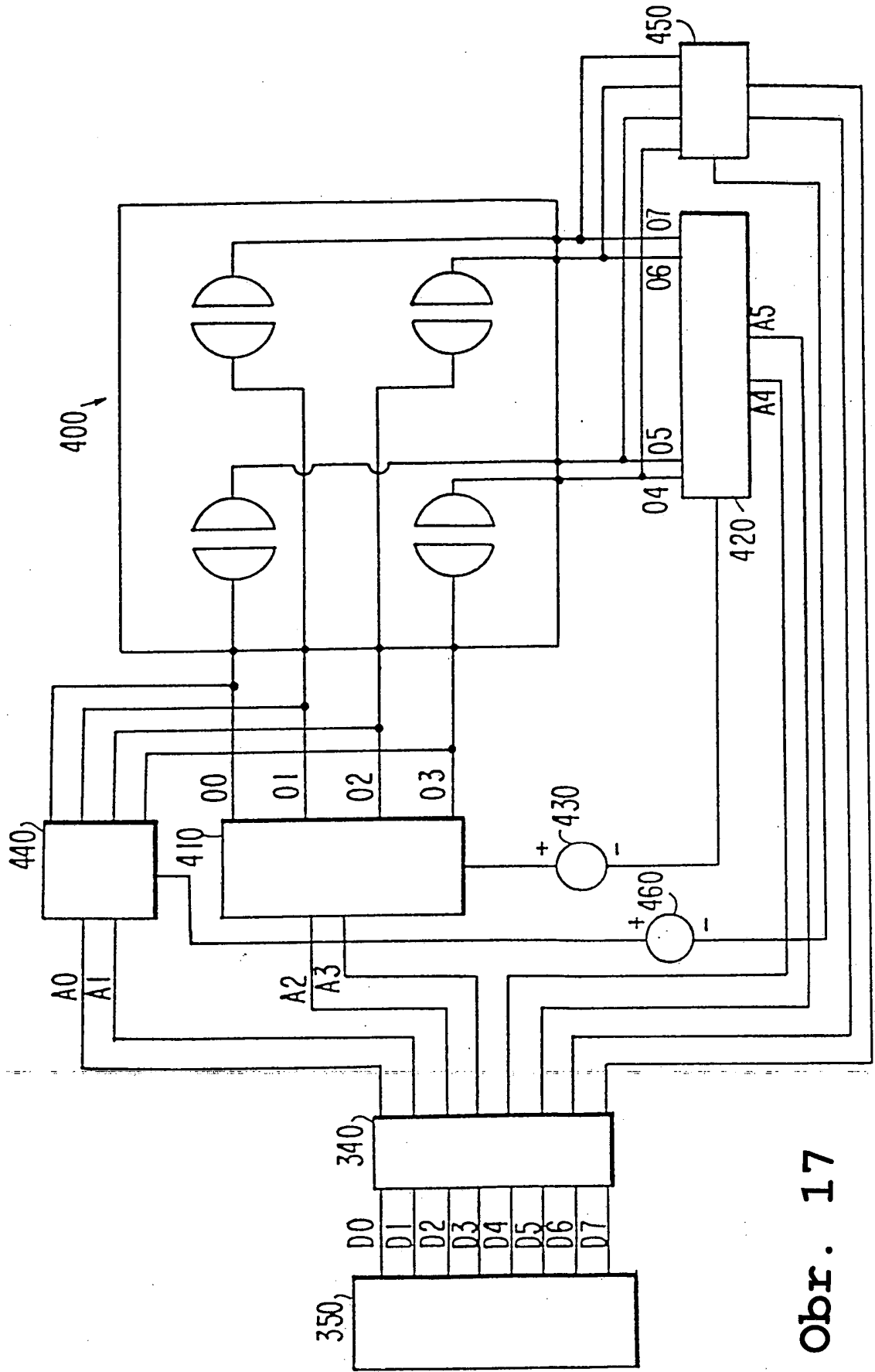


Obr. 16

9/26

17.07.98

2844-97

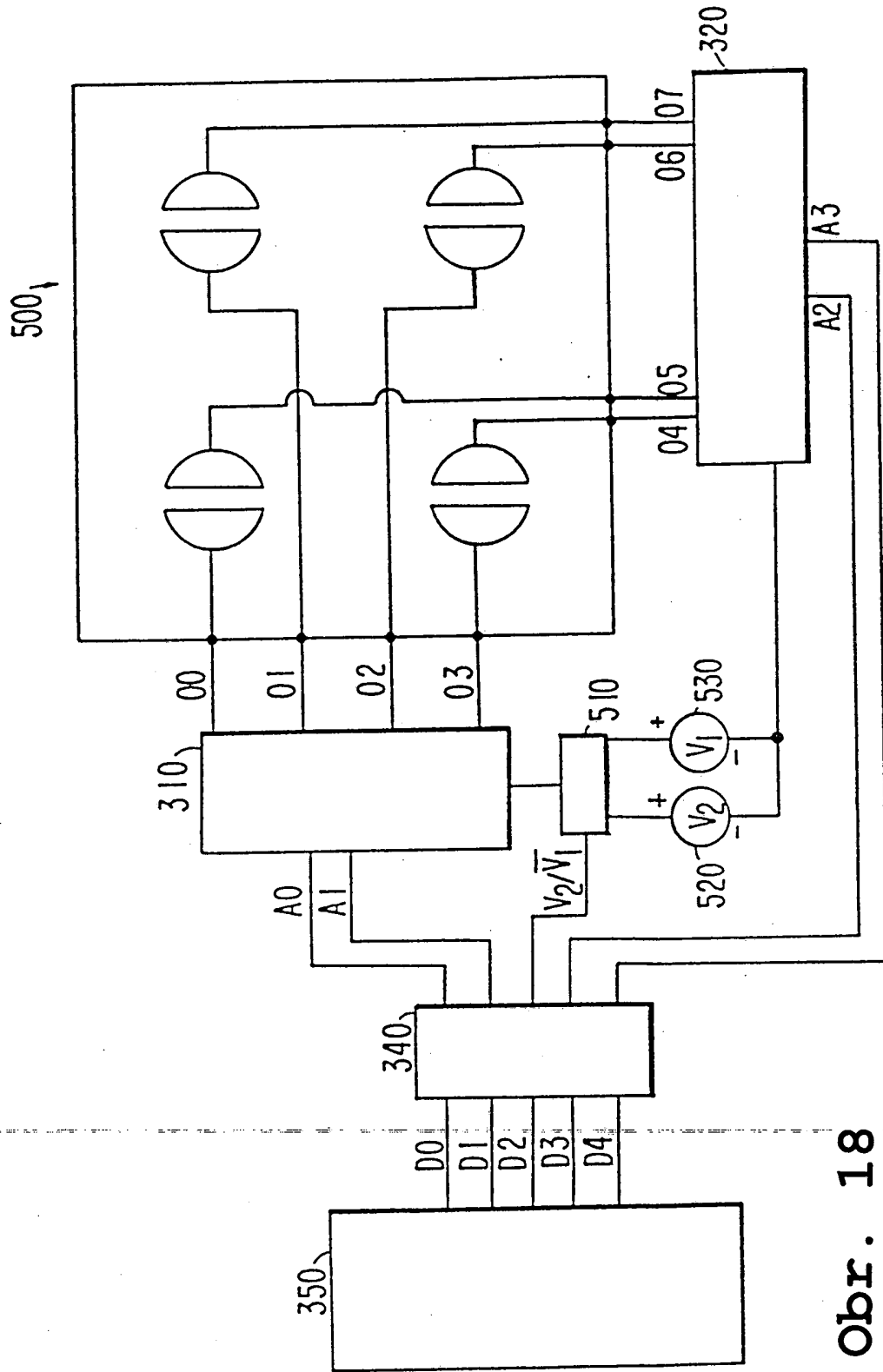


Obz. 17

17.07.98

2844-97

10/26



Obr. 18

17.07.98

2844-97

11/26

Obr. 19b

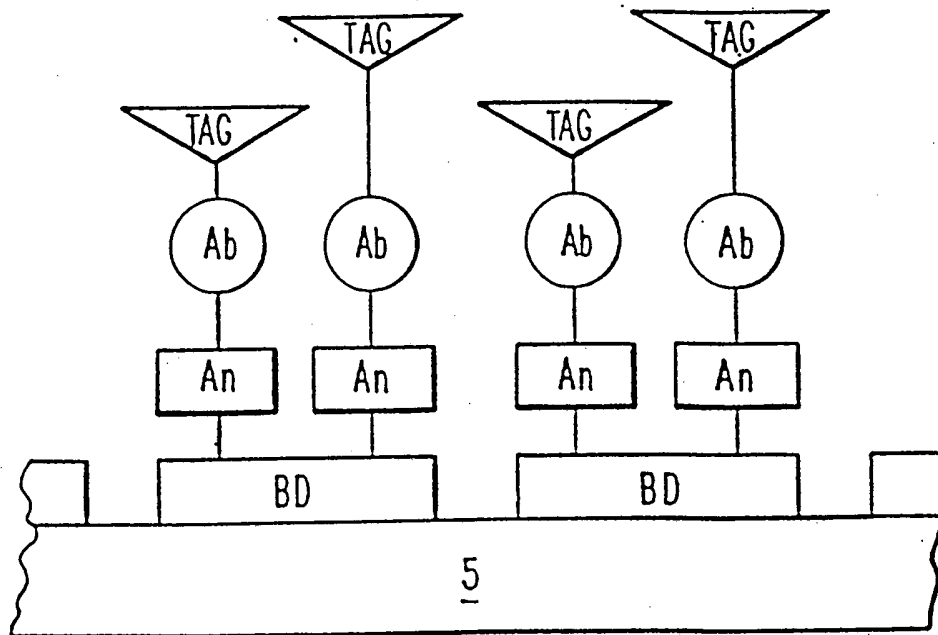
Obr. 19d



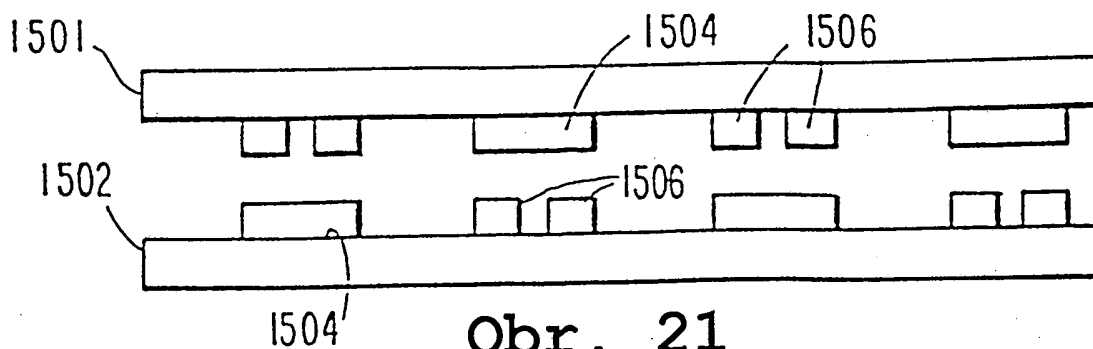
Obr. 19a

Obr. 19c

Obr. 19e

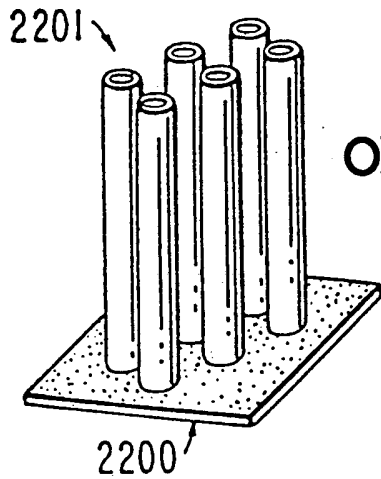


Obr. 20

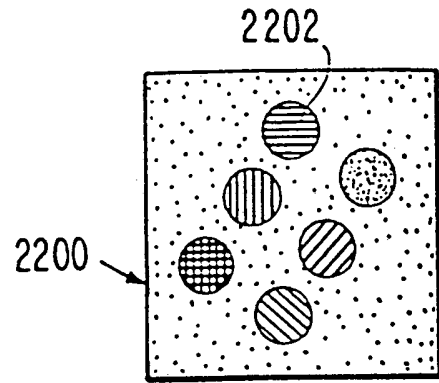


Obr. 21

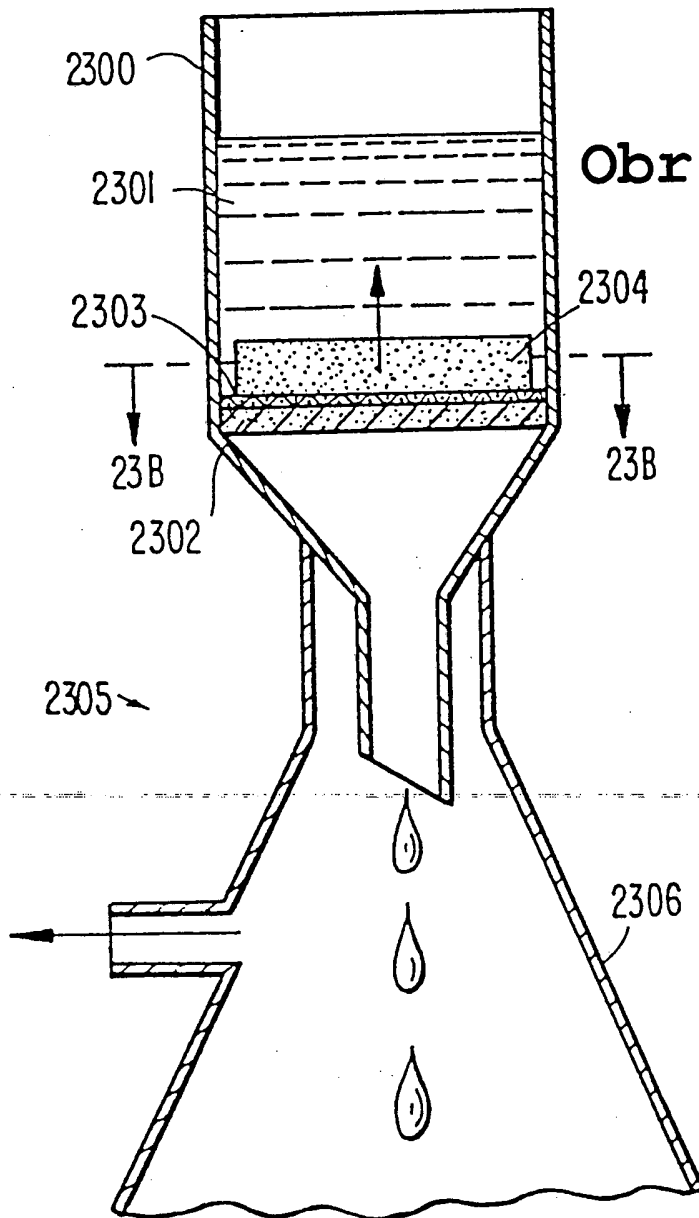
12/26



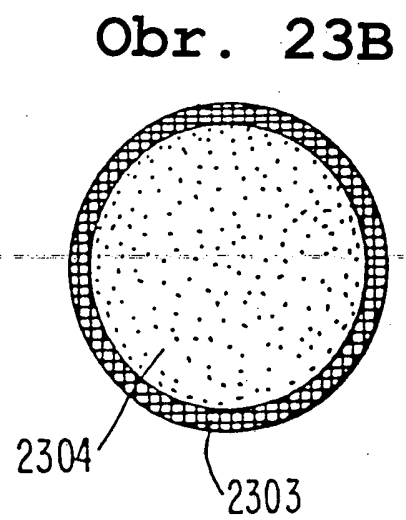
Obr. 22A



Obr. 22B



Obr. 23A



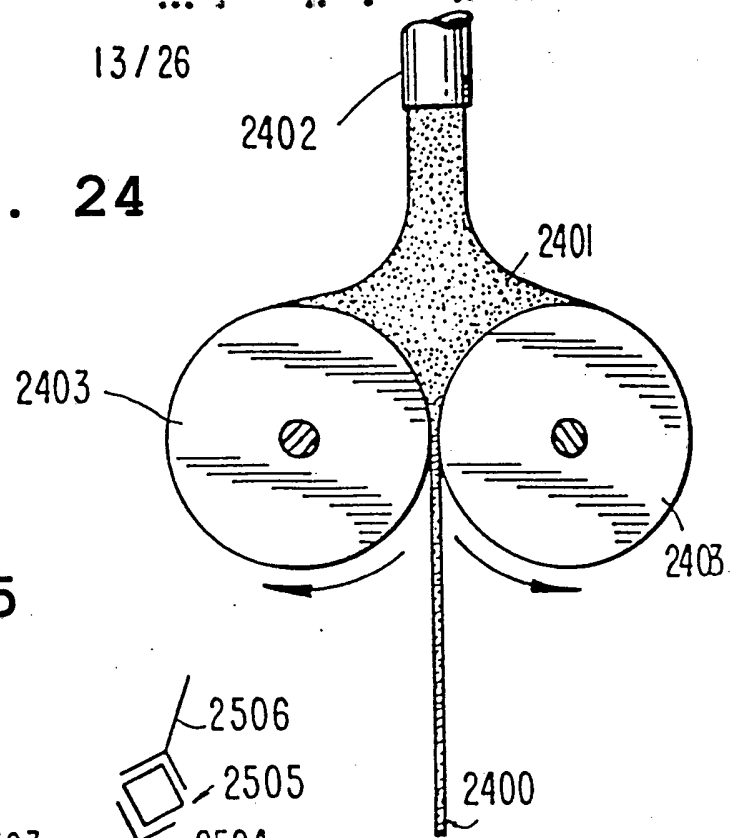
Obr. 23B

17.07.98

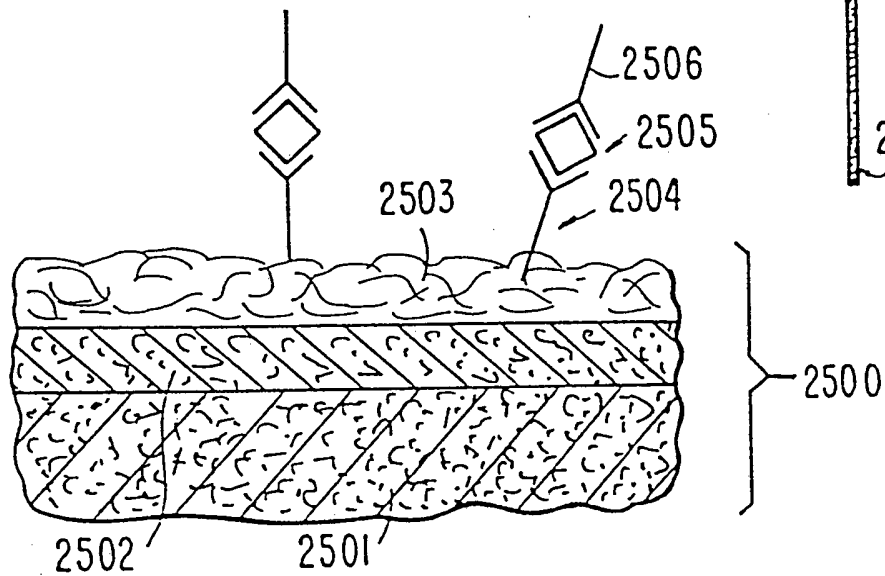
2844-97

13/26

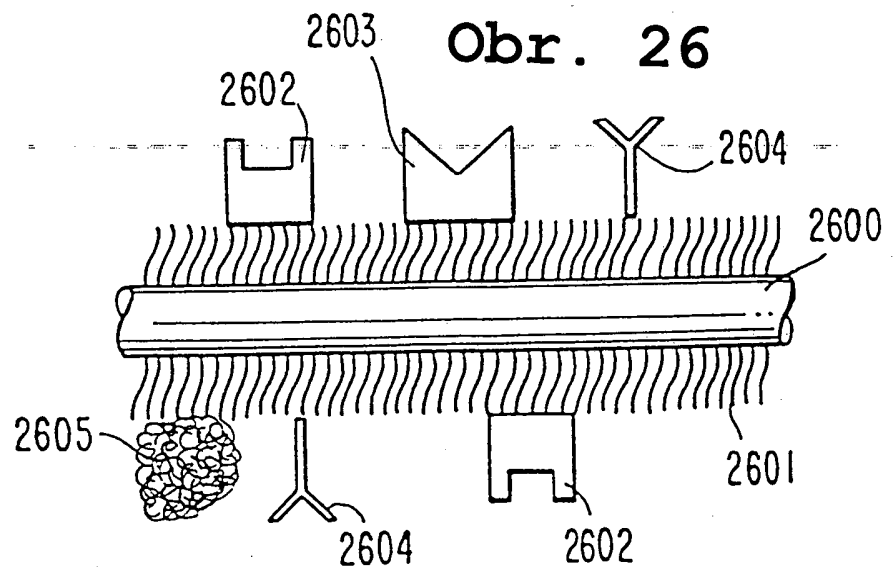
Obr. 24



Obr. 25



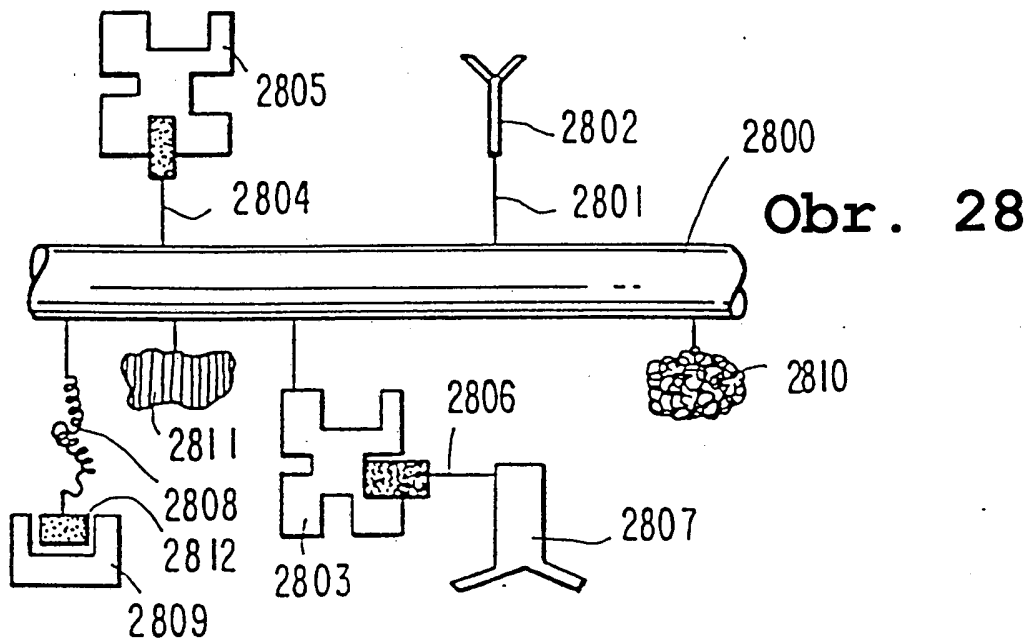
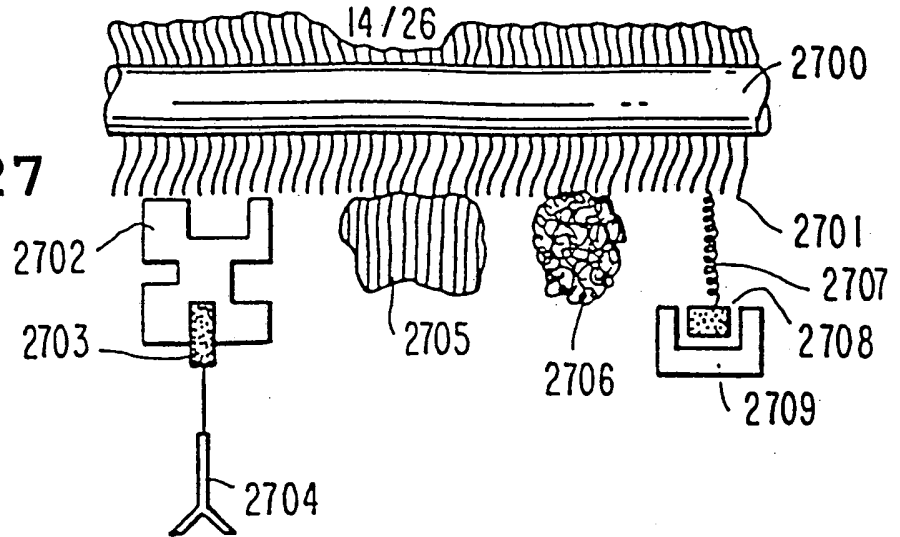
Obr. 26



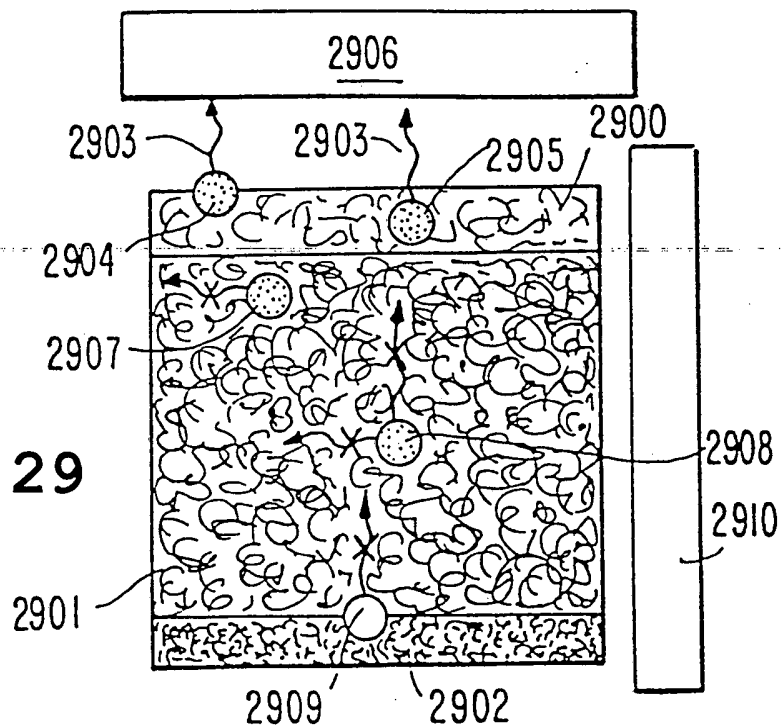
17.07.98

2844-97

Obr. 27



Obr. 29

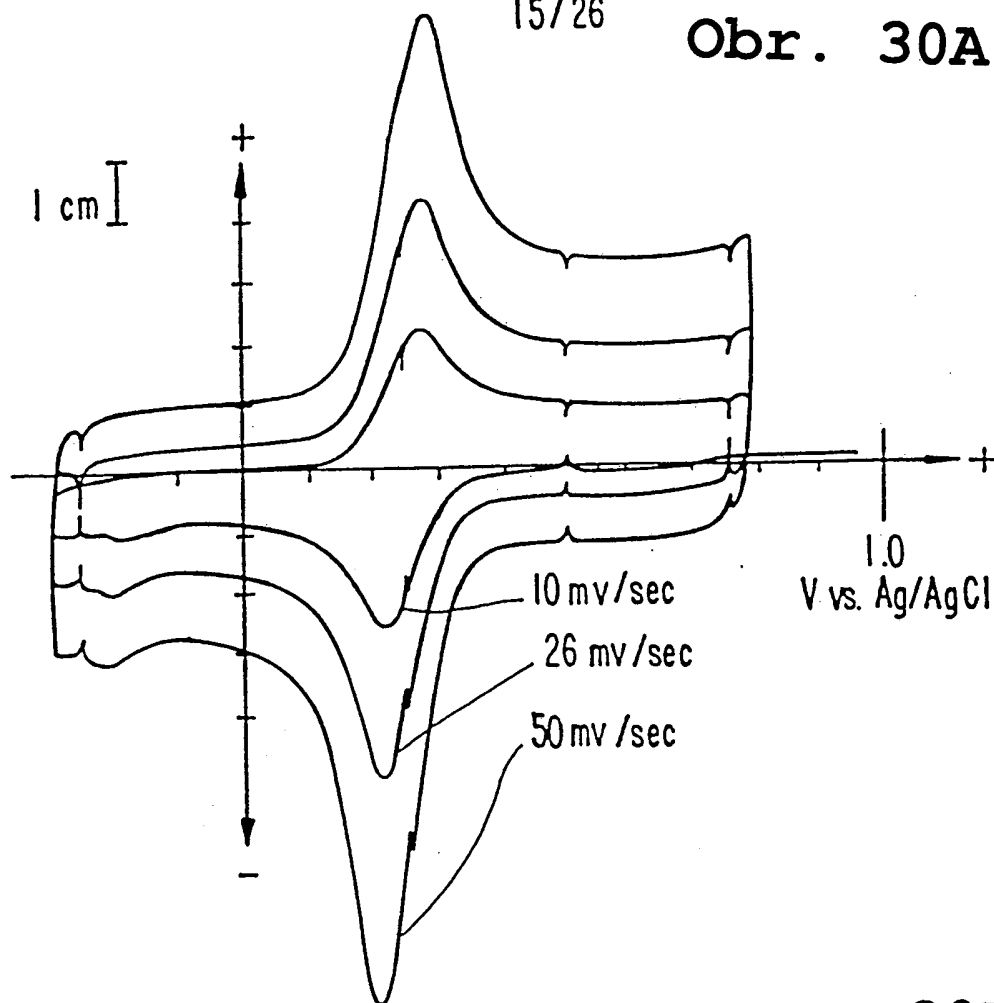


17.07.98

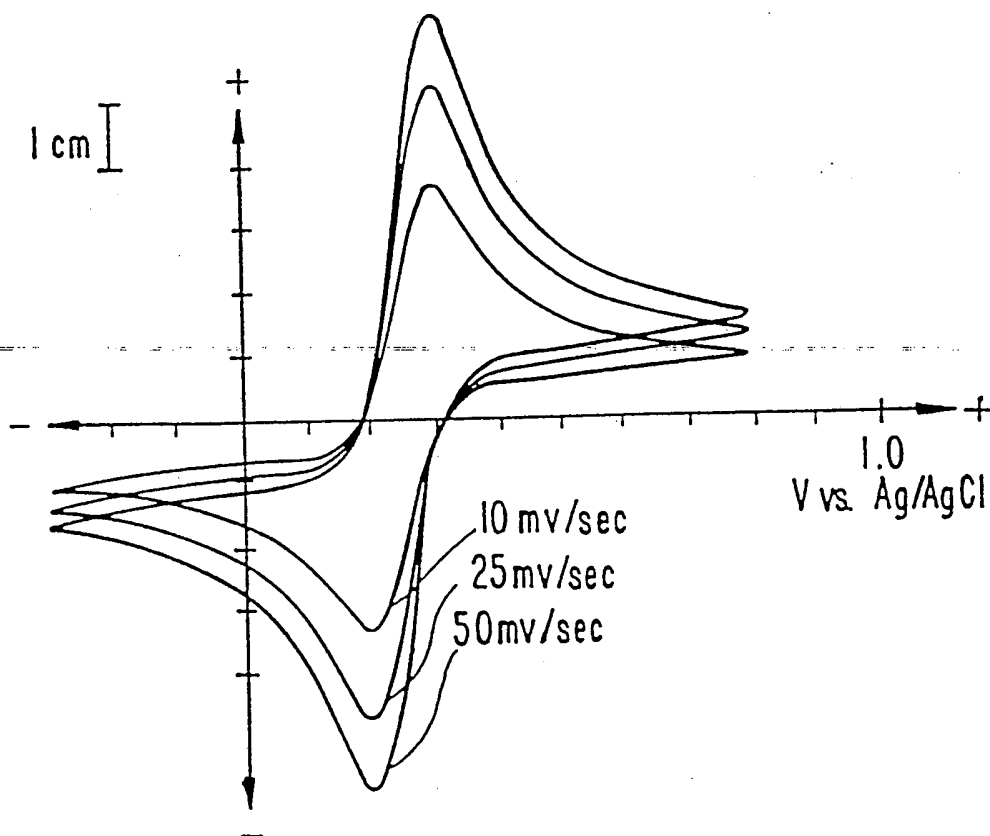
2844-97

15/26

Obr. 30A



Obr. 30B

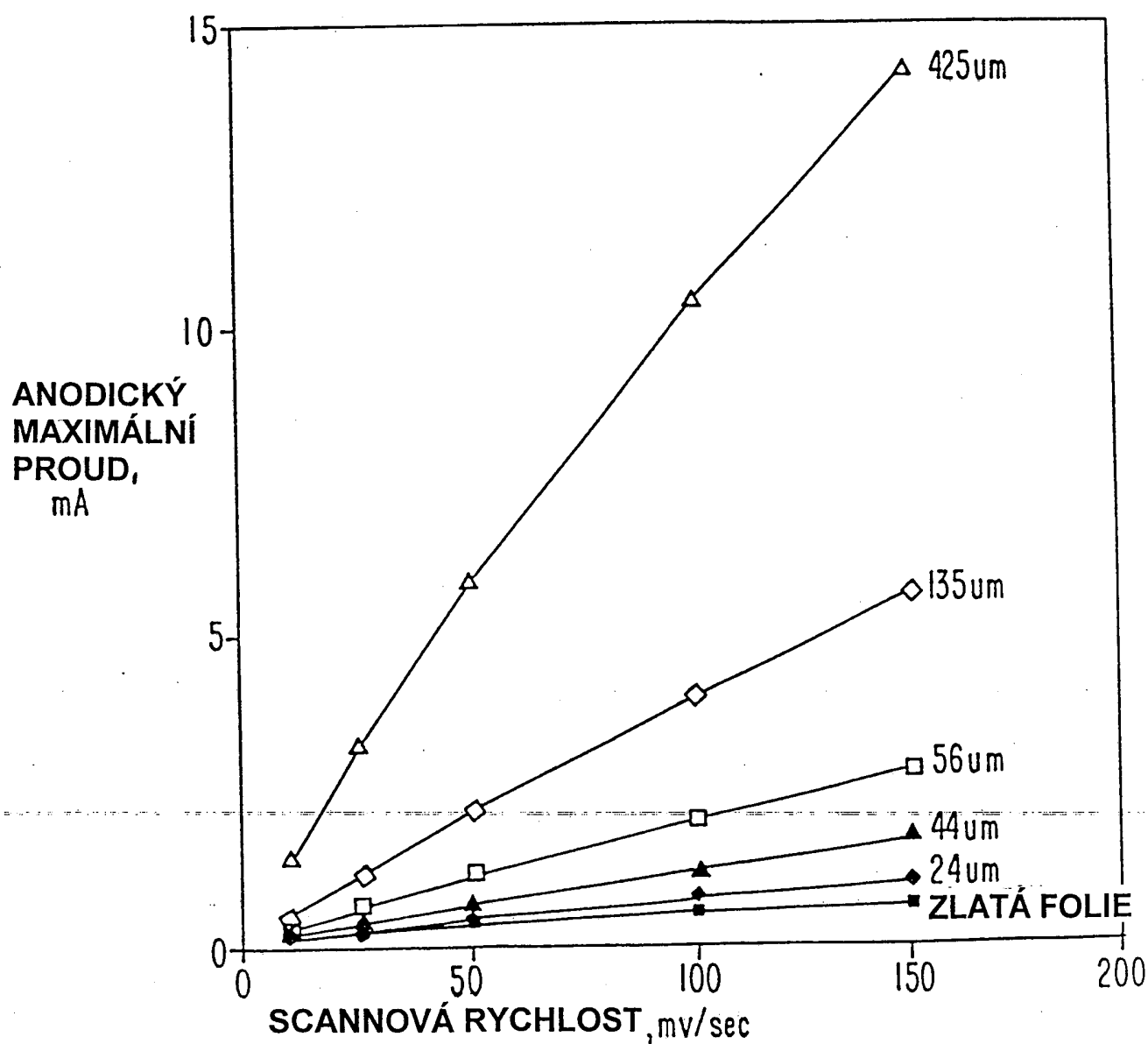


17.07.98

2844-97

16/26

Obr. 31



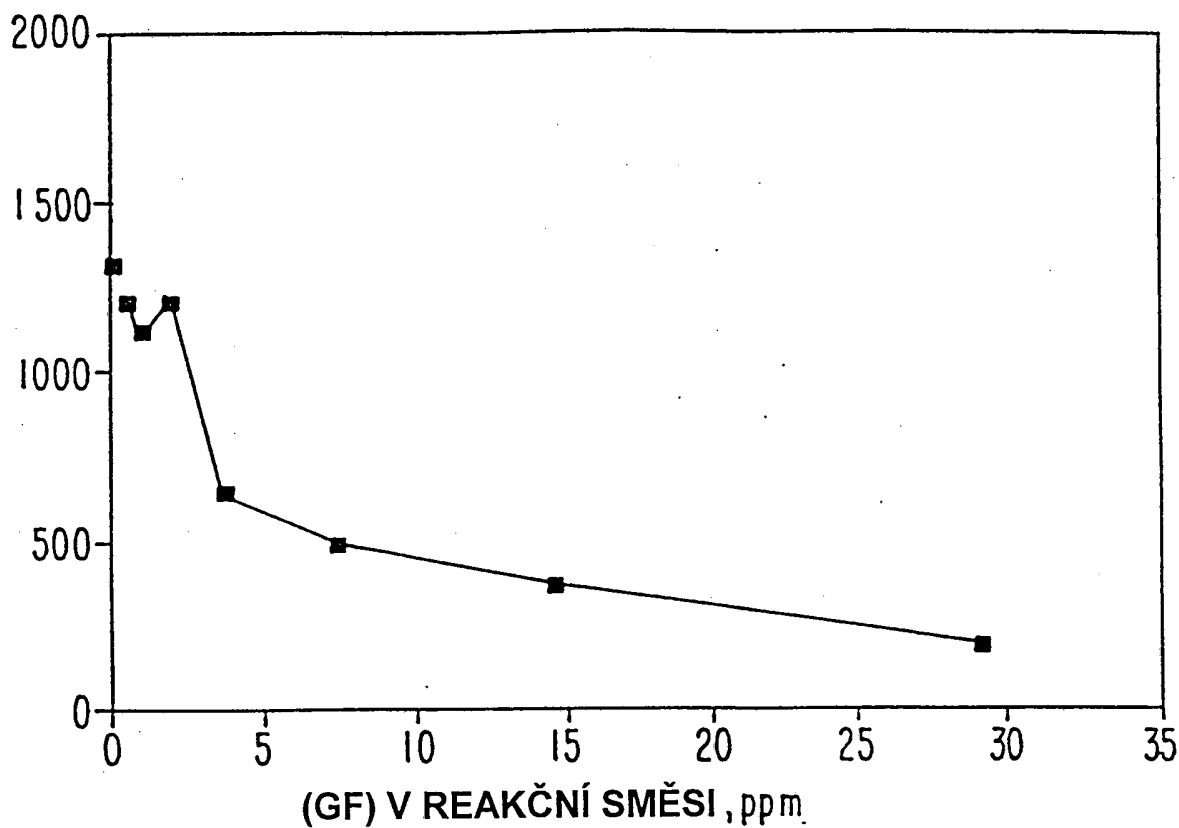
17.07.98

2844-97

17/26

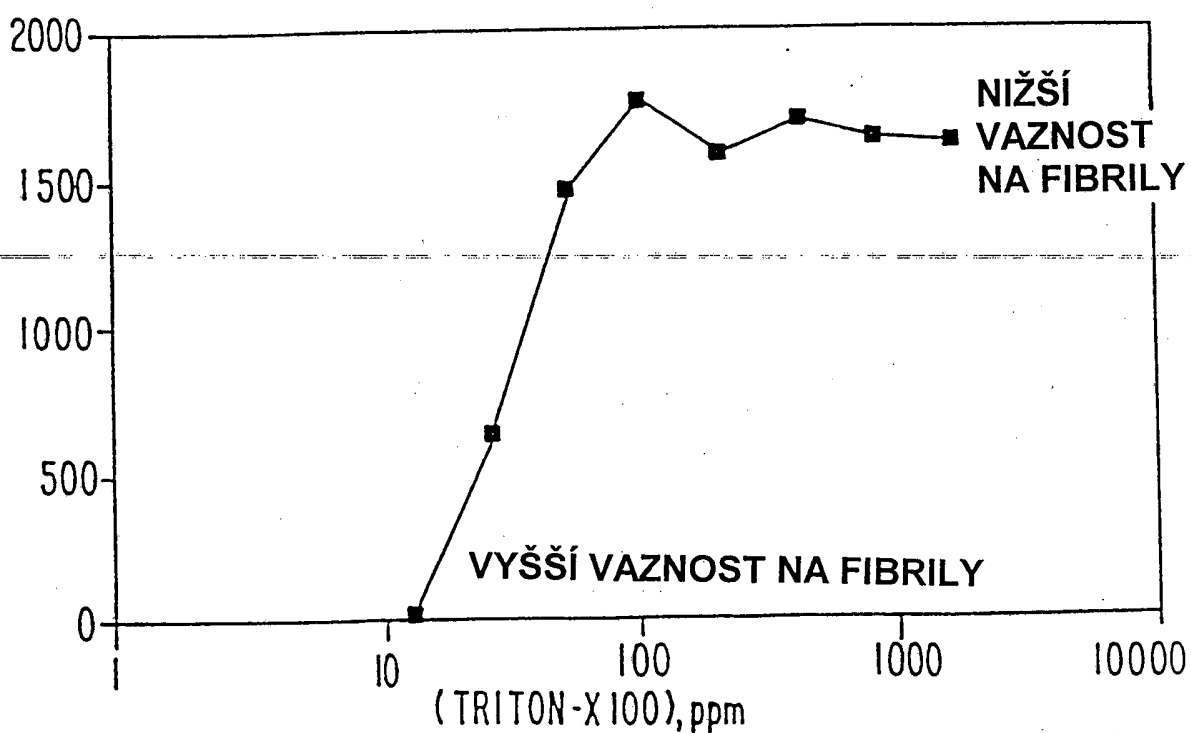
Obr. 32

ELC MAXIMÁLNÍ INTENZITA



ELC MAXIMÁLNÍ INTENZITA
SUPERNATANTU

Obr. 33

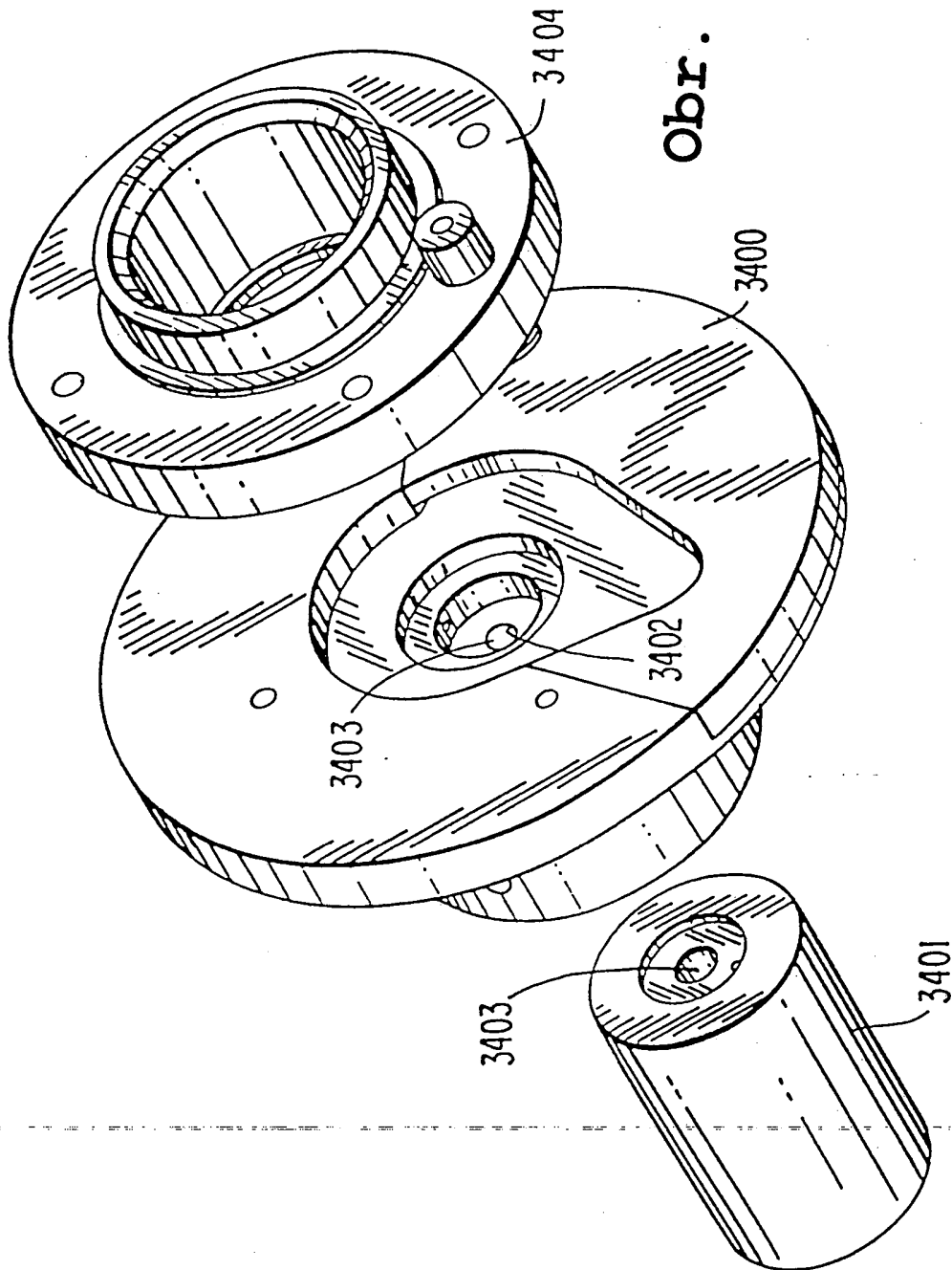


17.07.98

2845-97

18/26

Obz. 34

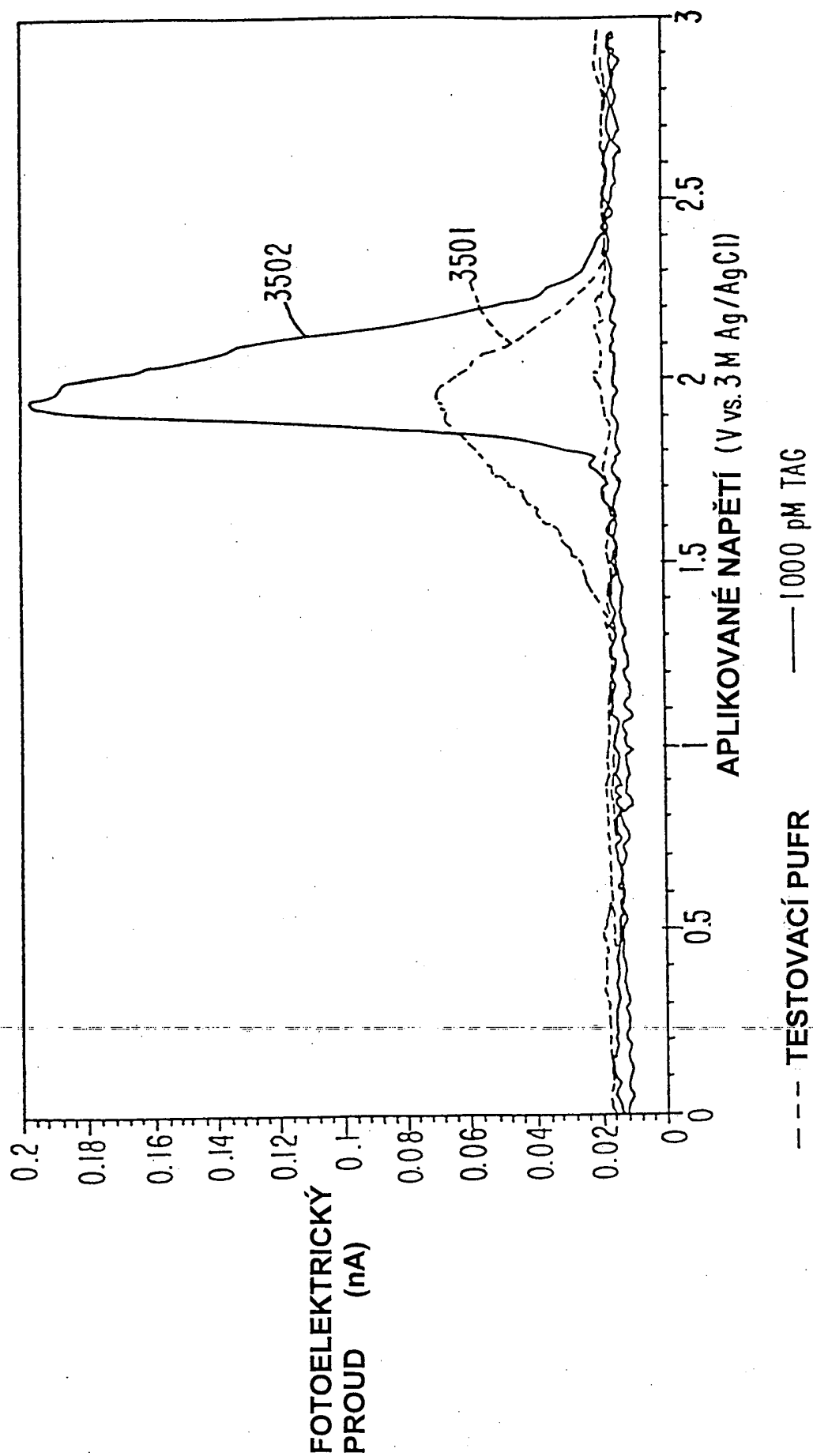


17.07.98

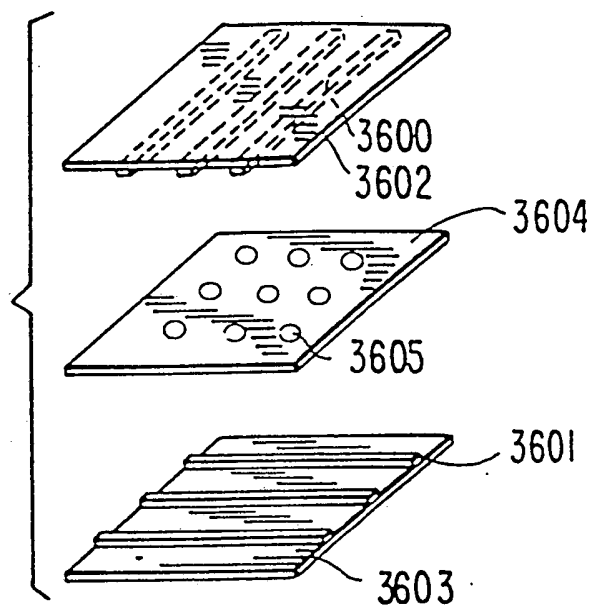
2854-97

19/26

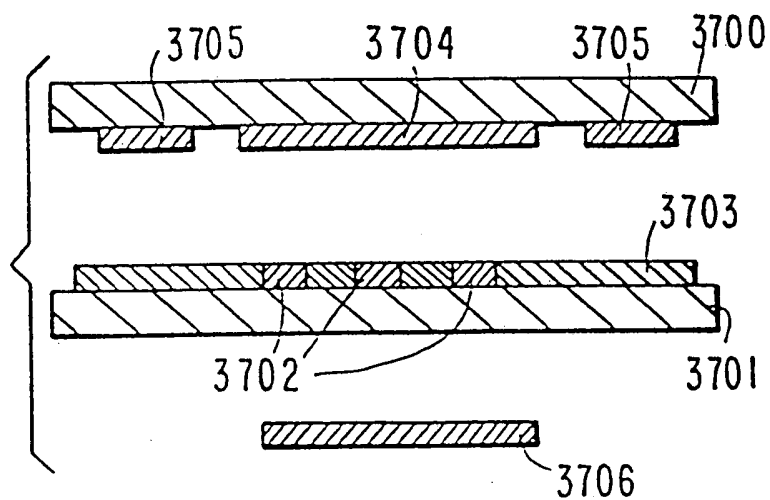
Obr. 35



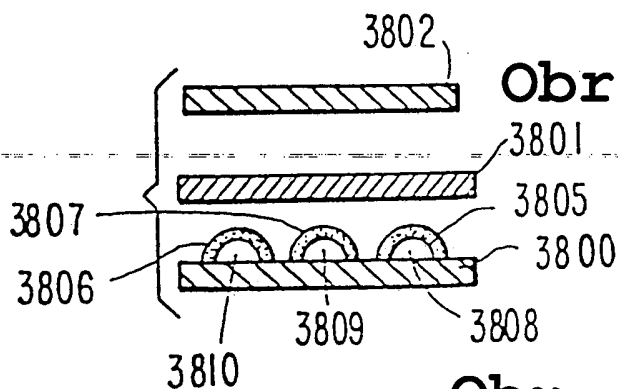
Obr. 36



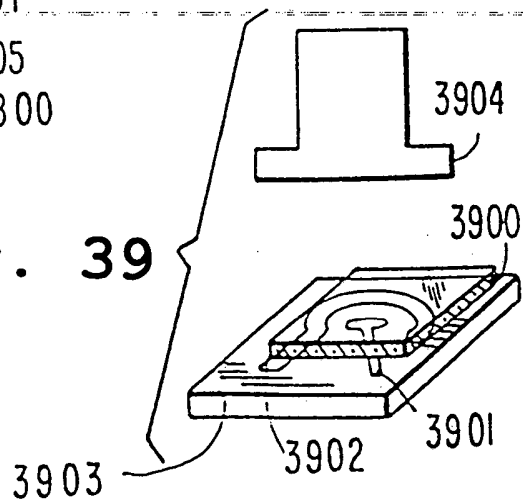
Obr. 37



Obr. 38



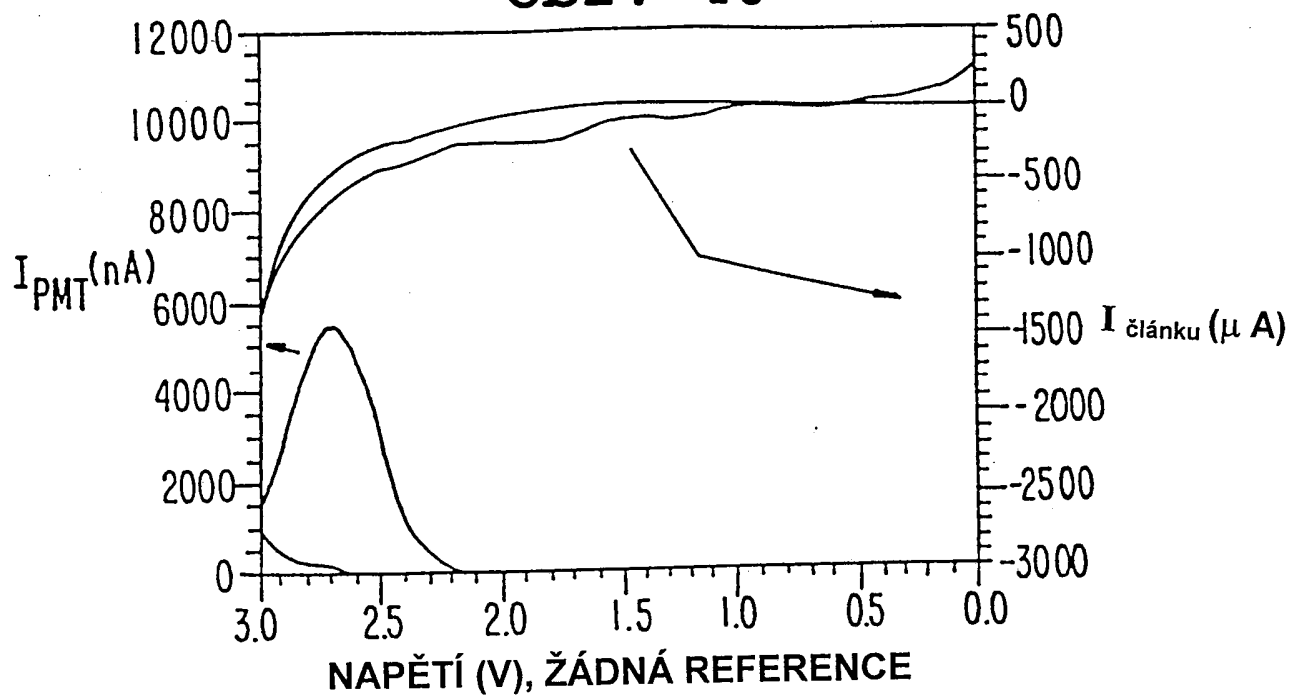
Obr. 39



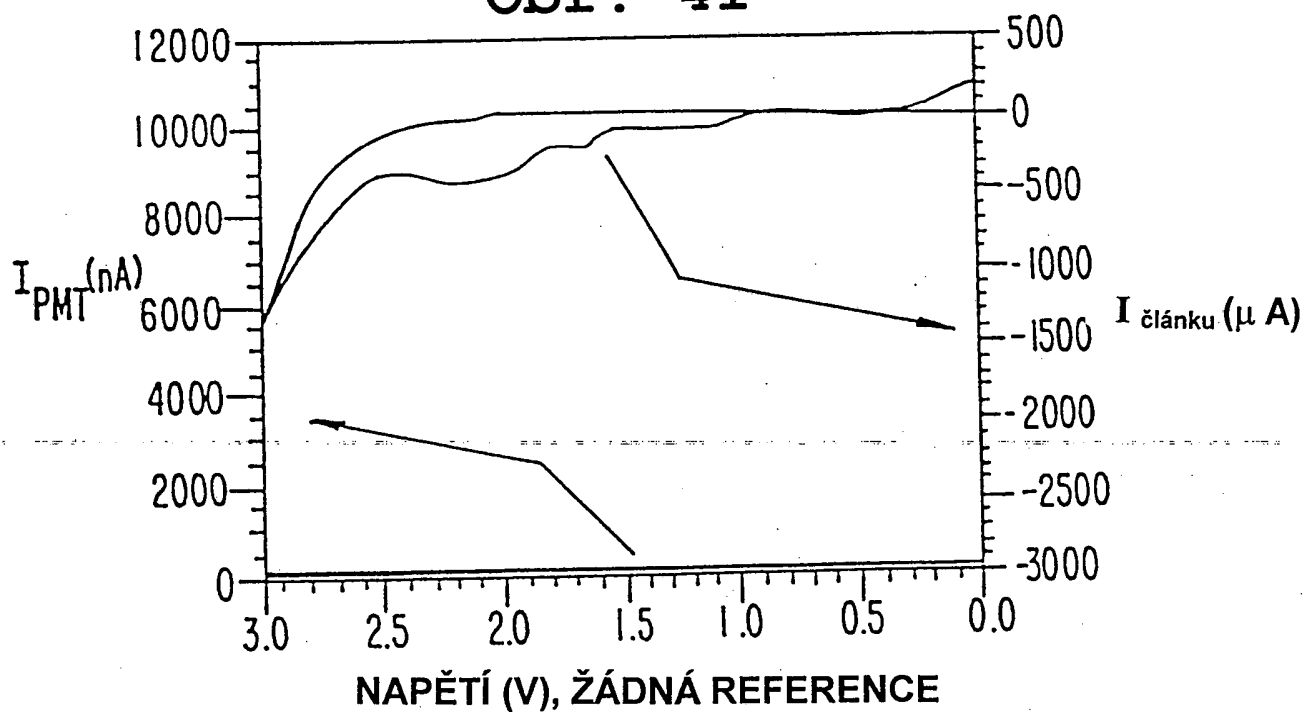
17.07.98

2844-97

Obr. 40



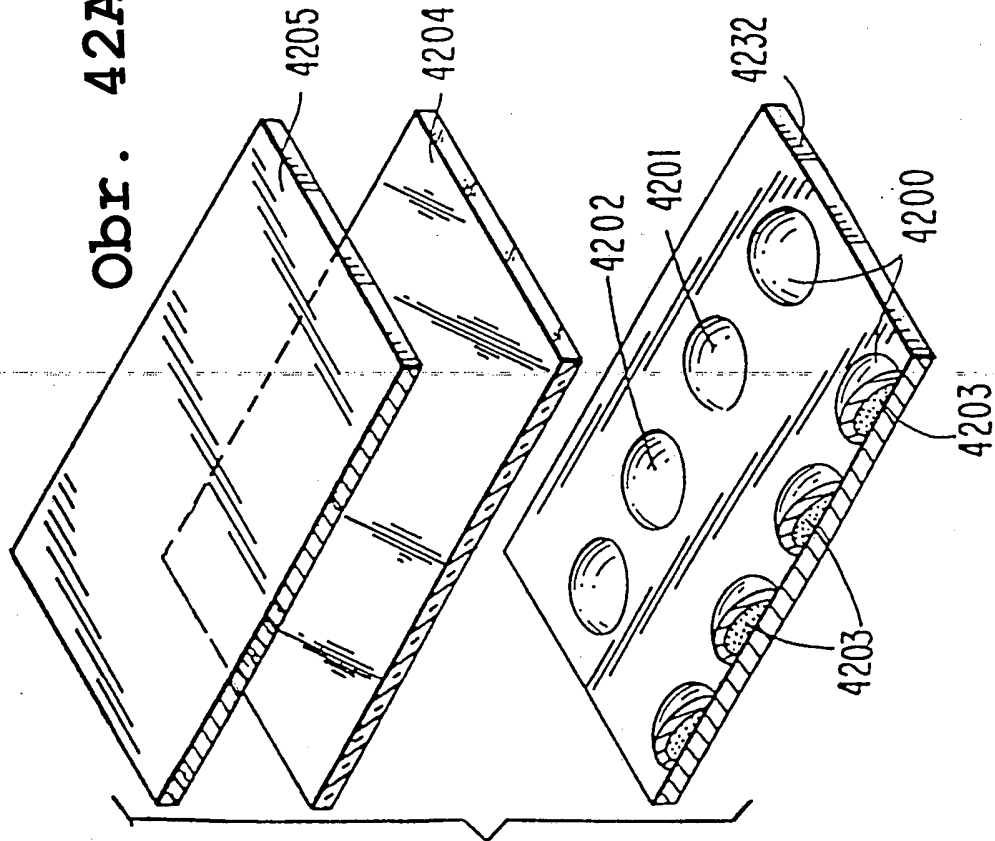
Obr. 41



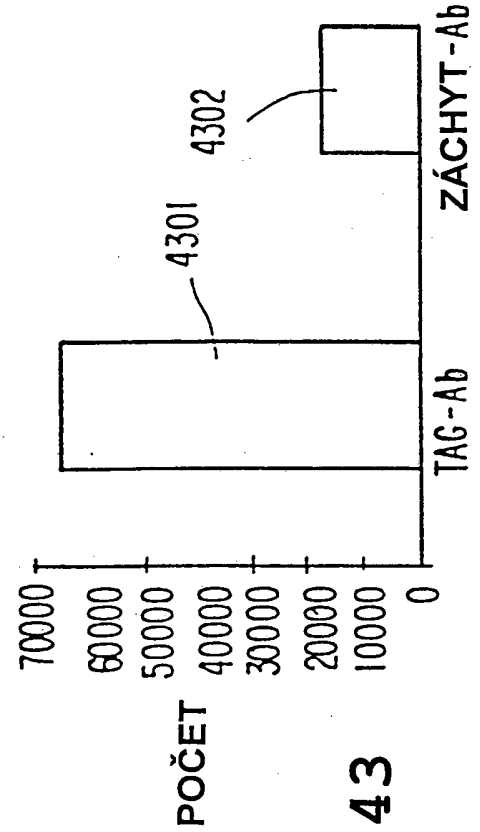
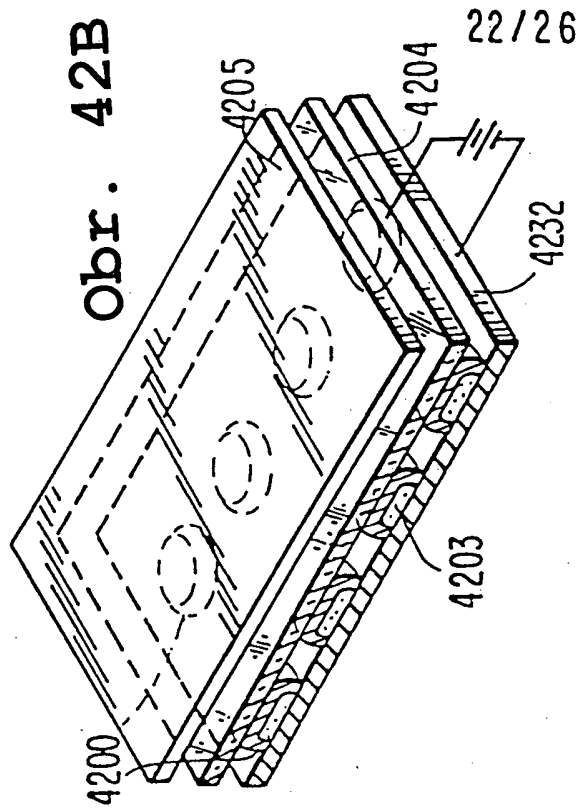
17.07.98

2844-97

Obr. 42A



Obr. 42B

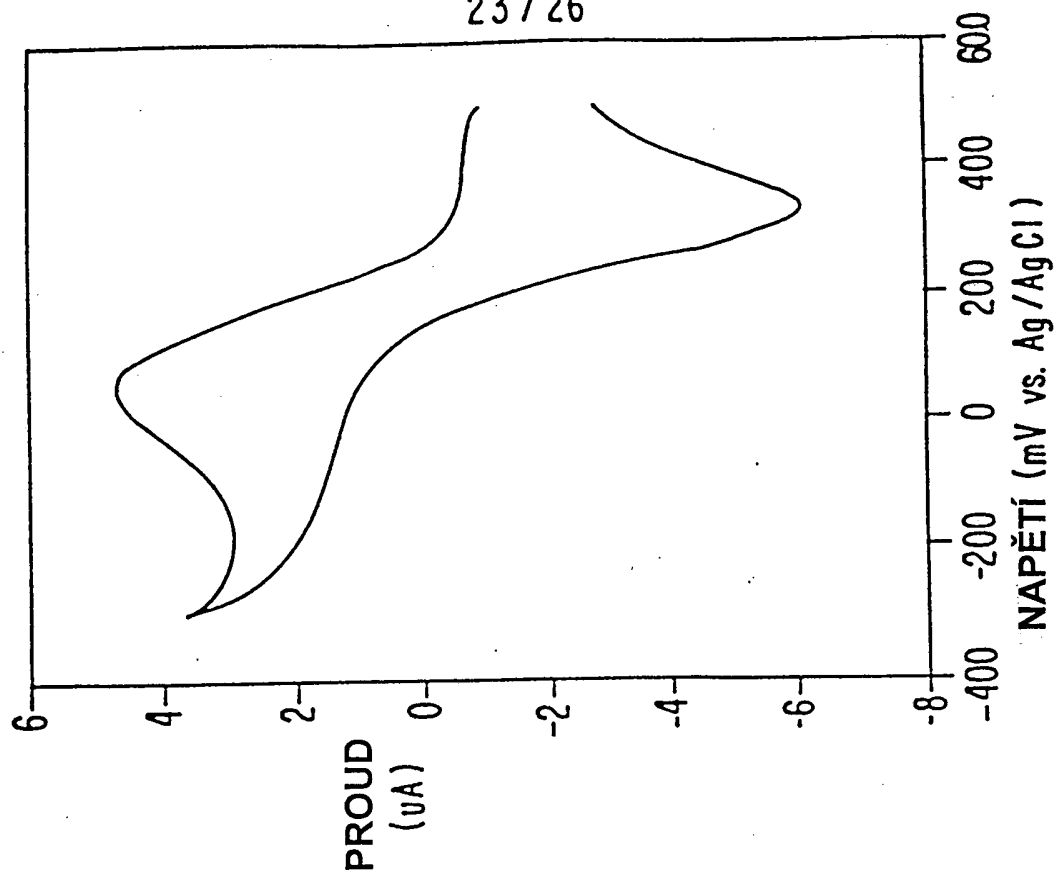


Obr. 43

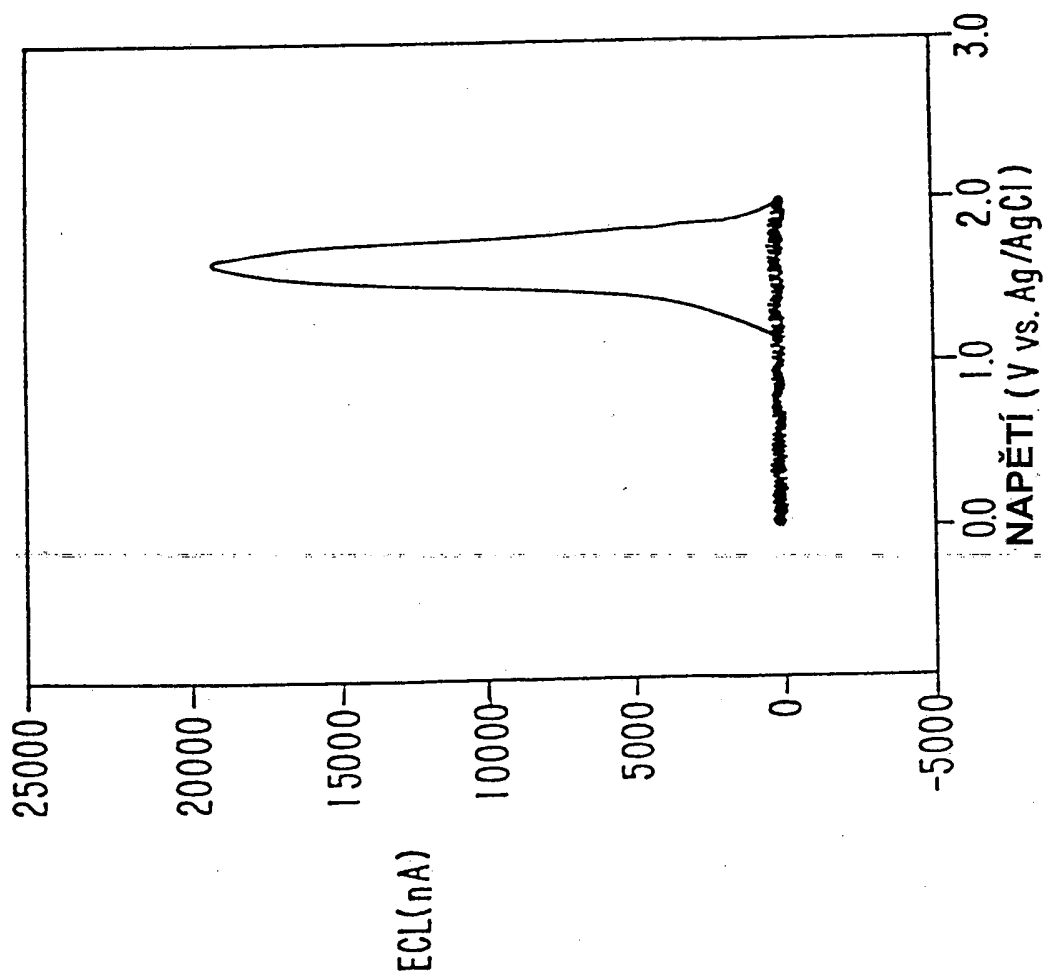
17.07.98

23/26

Obr. 44B



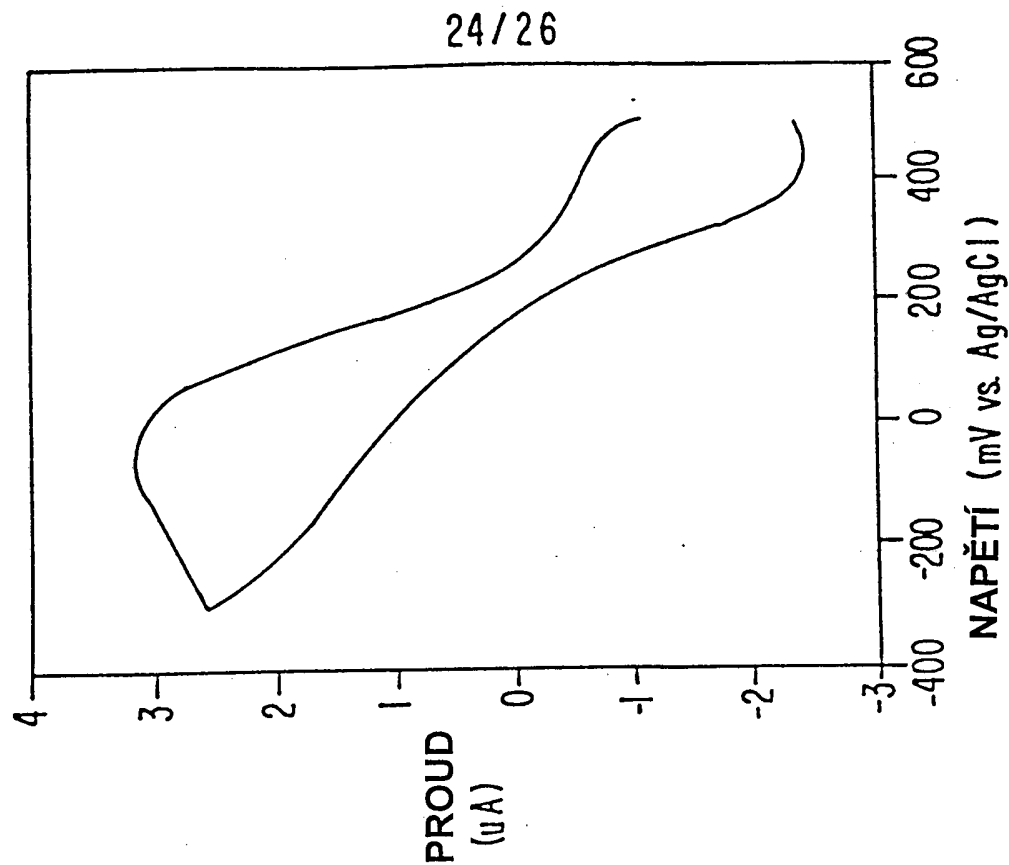
Obr. 44A



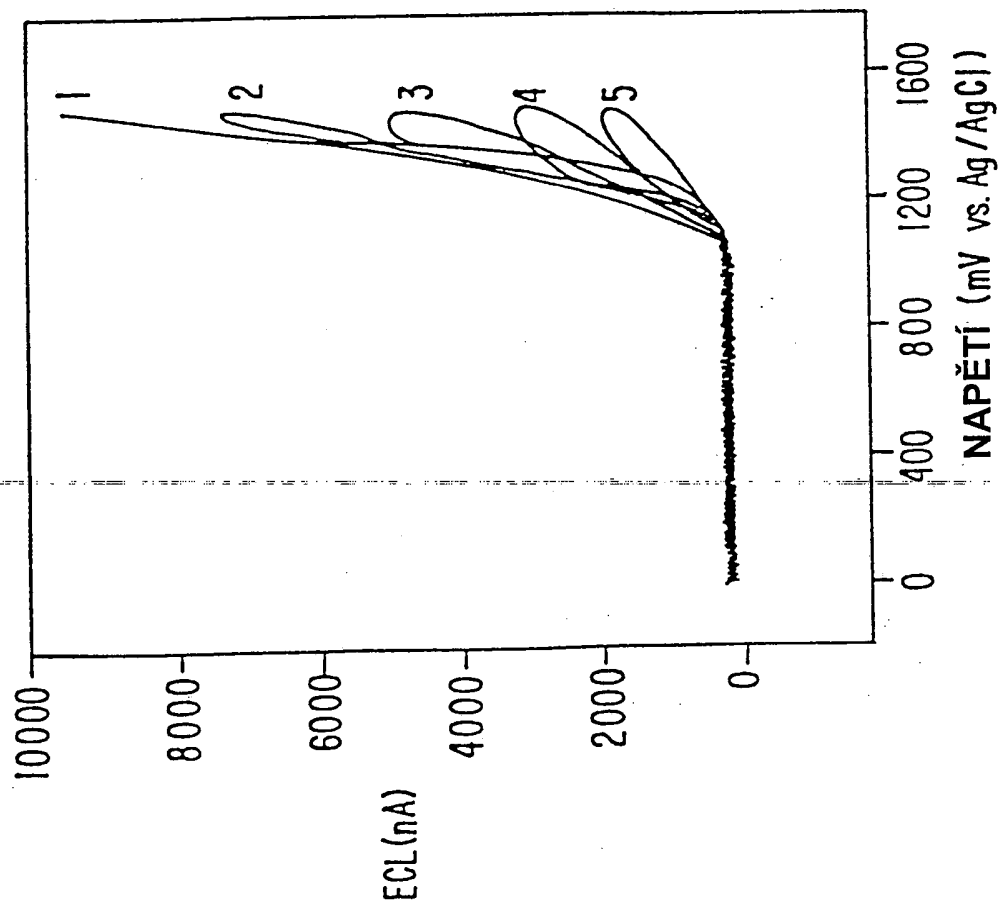
17.07.98

2844-97

Obr. 45B



Obr. 45A

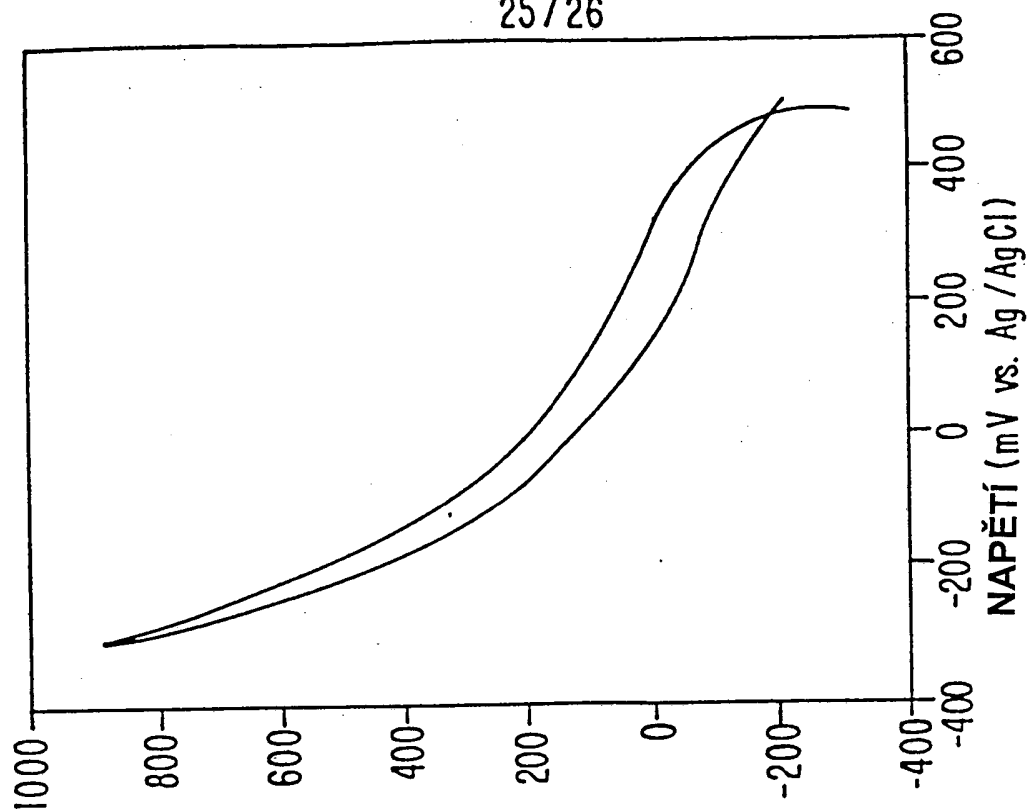


17.07.98

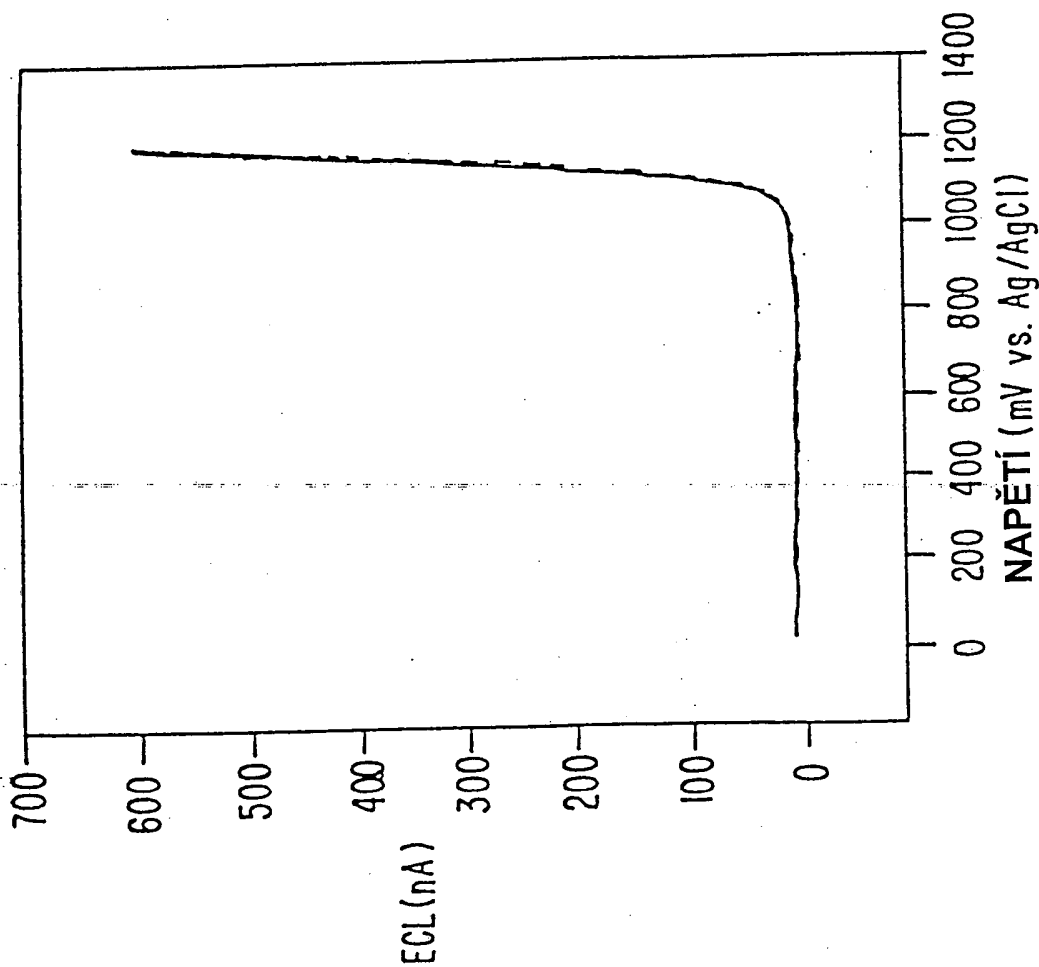
2844-97

25/26

Obr. 46B



Obr. 46A



- PRVNÍ SCAN ---DRUHÝ SCAN

17.07.98

PV 2845-97

26 / 26

Obr. 47

