

MINISTERIO DE INDUSTRIA
REGISTRO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL



~~26 NOV 1978~~

CONCEDIDA

PATENTE DE INVENCION

ES 11
21
22

NUMERO	464411
FECHA DE PRESENTACION	23 NOV. 1977

A1

Concedida al Registro de acuerdo con los datos que figuran en la presente descripción y según el contenido de la Memoria adjunta.

F.C. 20 JUL. 1978

30 PRIORIDADES:	32 FECHA	33 PAIS
31 NUMERO		
744.574	24 Noviembre 1976	U.S.A.

47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL	52 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	G01N	---

54 TITULO DE LA INVENCION
"Perfeccionamientos en los aparatos de electroforesis"

71 SOLICITANTE (S)
NATIONAL AERONAUTICS AND SPACE ADMINISTRATION

DOMICILIO DEL SOLICITANTE
Nasa Headquarters, Washington, D.C., U.S.A.

72 INVENTOR (ES)
Benjamin W. Grunbaum

73 TITULAR (ES)

74 REPRESENTANTE
M. Curell Suñol

EX-US
F-489

BAD ORIGINAL

P A T E N T E D E I N V E N C I O N

por VEINTE años

5. solicitada en España a favor de NATIONAL AERONAUTICS AND SPACE ADMINISTRATION, de nacionalidad norteamericana, domiciliada en Nasa Headquarters, Washington, D.C., U.S.A., por "Perfeccionamientos en los aparatos de electroforesis", con prioridad de la solicitud norteamericana 744.574 de fecha 24 Noviembre 1976. - - - - -

MEMORIA DESCRIPTIVA

10. La invención se refiere a un aparato de electroforesis que utiliza aplicadores de muestras múltiples para aplicar antisuero a una membrana o gel. - - - - -

15. Los aparatos anteriores de electroforesis utilizan el acetato de celulosa como medio de soporte para llevar muestras que se han de separar y analizar. Se utiliza un dispositivo de tensión controlada para mantener la membrana tesa y paralela a la base de la unidad sin soporte en el centro. Esta disposición impide la formación de charcos de líquido y retiene un contenido uniforme en humedad dentro de
20. la membrana. Los aparatos anteriores también proporcionan un

5. dispositivo de graduación que funciona de modo semiautomático para colocar individualmente ocho muestras en una fila sobre la membrana en una cualquiera de tres posiciones diferentes con respecto al cátodo y al ánodo y para tratarlos simultáneamente. - - - - -

10. Un inconveniente es que el aplicador aplica las muestras sólo una a la vez, lo que es laborioso y somete las muestras suministradas en primer lugar a una difusión local y movilidad debido a corrientes de convección durante el tiempo que se aplican las muestras subsiguientes. Este inconveniente se hace crítico cuando se necesita una resolución muy elevada en la electroforesis comparada de muestras desconocidas. - - - - -

15. Se da a conocer un ejemplo de dicha técnica anterior en la patente estadounidense nº 3.317.418 que fue concedida a Sec el 2 de Mayo de 1967. - - - - -

20. De acuerdo con la presente invención, se proporciona un aplicador de muestras múltiples, depósito de electroli-
to y tapa integrados y soporte de muestras múltiples. El
25. aplicador está adaptado para recoger muestras múltiples de depósitos correspondientes en el portamuestras como si fuesen una sola muestra. El aplicador tiene un pulsador central que, cuando se aprieta, hace que las puntas de cierto número de aplicadores toquen la superficie del fluido en el portamuestras y se llenen por acción capilar. Entonces se coloca el aplicador sobre la tapa de la celda electrolítica de modo

que se encaje en una ranura o posición predeterminada con respecto a los electrodos. Entonces se transfieren todas las muestras en un movimiento apretando el pulsador central. Las puntas del aplicador caen libre e independientemente sobre la membrana o gel en el depósito de electrolito. - - - - -

5. Cualquiera de los aplicadores puede oprimirse con independencia de los otros de modo que pueden depositarse cantidades crecientes de una muestra dada sobre el mismo punto, tal como podría requerirse en el caso de una concentración muy baja de soluto. Además, cada una de las puntas del aplicador puede substituirse por puntas de mayor volumen de capacidad, o puntas pueden introducirse en posiciones alternas para permitir zonas de aplicación de muestra más largas.-

10. Los aplicadores de muestras eliminan la necesidad de formación anterior de ranura y pueden cortar a través del gel y transferir todas las muestras en una sola operación. -

15. La tapa de la celda tiene ranuras de modo que puedan colocarse las muestras en cierto número de posiciones fijas espaciadas a intervalos iguales entre el cátodo y el ánodo. De esta manera es posible tratar un número de muestras al mismo tiempo escogiendo las ranuras apropiadas a lo largo de la tapa de la celda. - - - - -

20. El portamuestras trabaja conjuntamente con el aplicador de muestras múltiples y contiene cierto número de filas que contienen correspondientes vasos al número de aplica

5. dora de muestras múltiples. Tubos capilares de un solo uso se utilizan para cargar los depósitos con muestras nuevas. Con anterioridad al llenado de los vasos, se establecen celdas electroforéticas que contienen los tampones debidos necesarios para la determinación de los constituyentes deseados y se etiqueta debidamente cada celda. Entonces se utiliza el aplicador para recoger muestras individuales múltiples desde el portamuestras y transferirlas simultáneamente a la membrana de soporte en una posición predeterminada más próxima bien al electrodo negativo más bien al positivo. - - - - -

10. En los dibujos: - - - - -

la Figura 1 es una vista en sección transversal por una línea paralela al tabique divisor (23) de la Figura 2E;

15. las Figuras 2A-2E son vistas expandidas en alzado y en sección del aparato de electroforesis de la Figura 7, que ilustran el conjunto de aplicador, la tapa de plexiglás, la tapa intermedia, el portamembrana, y el depósito, respectivamente; - - - - -

20. la Figura 3 es una vista en planta de la tapa ilustrada en la Figura 2C; - - - - -

las Figuras 4A y 4B son vistas en planta y en alzado lateral, respectivamente, de un portamuestras para su uso con el conjunto aplicador de la Figura 2A; - - - - -

las Figuras 5A y 5B son vistas en planta y en alzado

do lateral, respectivamente, de una placa de temperatura controlada para su uso con el aparato de las Figuras 1 y 2; - -

5. Las Figuras 6A y 6B son un detalle y una vista terminal, respectivamente, de la punta aplicadora ilustrada en la Figura 2A; - - - - -

Las Figuras 7A y 7B son vistas en alzado frontal y sección transversal, respectivamente, de uno de los electrodos ilustrados en la Figura 2B; - - - - -

10. La Figura 8 es una vista en alzado frontal del depósito de la Figura 2E con la placa de temperatura controlada de la Figura 5A en su sitio; - - - - -

La Figura 9 es una vista en planta del aparato de la Figura 1 ilustrando la conexión eléctrica a los electrodos; y - - - - -

15. La Figura 10 es una ilustración de distintas muestras tomadas sobre una membrana utilizando el aparato de la invención. - - - - -

20. Con referencia a los dibujos, un aparato de electroforesis comprende un depósito 10 para una solución de electrolito. Dentro del depósito hay deflectores fijos 19, deflectores amovibles 24, un tabique 23 y portaelectrodos 26, 28 que se extienden desde ranuras en la pared interior 8 hasta ranuras en la pared interior 9. Un portamembranas 14

- está asentado sobre el tabique 23 y dos de los deflectores
movibles 24. El canal 20 del portamembranas 14 está a cabe
llo de la parte superior del tabique 23. El portamembranas
14 está dotado de orejas 21, 22 de sujeción y dientes 18. Los
5. dientes encajan en perforaciones en una membrana 16 y mantie
nen la parte central de la membrana tensa. Los extremos de la
membrana 16 están sumergidos en la solución de electrolito
(no ilustrada). La membrana debe ser de un material que chupe
la solución de electrolito hasta todas las zonas de la membra
10. na para mantener la membrana saturada. Además, la membrana
debe tener suficiente resistencia para resistir la fuerza de
los dientes cuando la membrana está húmeda. La membrana pue
de constituirse, por ejemplo, en acetato de celulosa, papel
o cellegal. Una membrana de acetato de celulosa puede almacen
15. narse como archivo permanente del análisis, un factor impor
tante en la ciencia forense. - - - - -

- Un conjunto 30 de aplicador se adapta sobre la tapa
12, y tiene dos patas 33, 34. La pata 34 tiene una clavija 38
de registro que sobresale de la misma y la pata 33 tiene un
20. nervio 35 que sobresale de la misma. La clavija 38 y nervio
35 están adaptados para encajarse en una ranura para el ner
vicio y agujeros de registro o bien en la tapa de la Figura 3
bien en el portamuestras de la Figura 4. - - - - -

- La tapa 12 incluye conectadores macho y hembra 11
25. y 13 que hacen contacto con el hilo 29 de electrodo por me
dio de enclavamientos elásticos 15 y 17, respectivamente, en

5. el portaelectrodo 26. Cuando se retira la tapa 12 de la parte superior del depósito 10, se rompe la conexión eléctrica al hilo 29 de electrodo por medio de los enclavamientos elásticos. Se ilustra el hilo 29 de electrodo con mayor detalle en las Figuras 7A y 7B. Se tiende un hilo 29 de platino alrededor de la periferia ranurada del portaelectrodo 26. El hilo está conectado a contactos metálicos 25 y 27 que completan un circuito a los enclavamientos elásticos 15 y 17 tal como se ilustra en la Figura 1. Tal como se ilustra en la Figura 10. 28, hay dos portaelectrodos 26 y 28 en el depósito 10 que tienen ranuras en sus paredes para recibir los portaelectrodos.-

15. Con referencia a la Figura 2A, el conjunto 30 de aplicador comprende una pluralidad de pulsadores 39 adaptados para sostener un aplicador que se ilustra con detalle en la Figura 6. - - - - -

20. Los pulsadores 39 están mantenidos individualmente en su lugar por una pluralidad de resortes laminares 45. Un pulsador 40 de liberación tiene un brazo largo 41 que se extiende a través de todos los resortes laminares paralelos 45. Cuando se aprieta el pulsador 40 hacia abajo, se liberan todos los resortes laminares de modo que todos los pulsadores 39 de aplicador se encuentren libres para caer. El pulsador 40 de liberación está dotado de una ranura 42 con lo que una barra 44 de bloqueo se encuentra libre para deslizarse en la ranura y mantener el pulsador de liberación en la posición 25. baja u oprimida. Cuando no se utiliza el aplicador 30, se co

loca sobre la tapa 12 una tapa protectora 31 de plexiglás.
Figura 2B. - - - - -

5. Con referencia a las Figuras 6A y 6B, la punta apli-
cadora 46 incluye una abertura capilar 47 para retener el
fluido de la muestra. La punta 46 está retenida en su sitio
por dos pasadores hendidos 49 de resorte, de modo que la pun-
ta es fácil de retirar. - - - - -

10. La longitud o anchura de la punta 46 puede modifi-
carse para variar la cantidad de muestra retenida o para
abarcos más de una posición de aplicador. - - - - -

15. Con referencia a la Figura 2D, el portamembrana
14 es de una sola pieza de plástico flexible moldeado dotado
de dientes 18 que pueden doblarse hacia dentro para sujetar
perforaciones correspondientes de una membrana 16. Cuando se
libera, el portamembrana 14 aplica una fuerza de tracción
a la membrana y la mantiene tensa. Para evitar romper la mem-
brana, los dientes 18 son preferentemente salientes semici-
lindricos o cilindricos y las perforaciones 113 de la membra-
na, Figura 10, son circulares. - - - - -

20. Con referencia a la Figura 3, la tapa intermedia
12 incluye un nivel 50 para nivelar a ojo todo el aparato.
Una ranura 52 y agujeros 54 están previstos para recibir el
nervio 35 y las clavijas 38 de registro del conjunto aplica-
dor 30. Las ranuras 56 de aplicador permiten que las puntas
25. aplicadoras 46 atraviesen las mismas cuando se aprietan los

pulsadores 39 de aplicador, bien individualmente, bien conjuntamente por medio del pulsador 40 de liberación. - - - -

5. Diez puntas aplicadoras paralelas 46 pueden atravesar una de las ranuras 56 según la ranura que se escoja colocando la clavija 38 de registro en el conjunto aplicador 30 en uno de los agujeros 54. - - - - -

10. Con referencia ahora a las Figuras 4A y 4B, hay un portamuestras 50 dotado de una junta 62 de goma para cerrar selladamente una tapa 64 de plexiglás que puede colocarse sobre el portamuestras. El portamuestras está dotado de una ranura 66 y agujeros 68 para recibir el nervio 35 y clavija 38 de registro del conjunto aplicador 30. - - - - -

15. El portamuestras 60 tiene una pluralidad de vasos 70 de muestras en filas correspondientes a los agujeros pequeños (A-F). Cada fila contiene diez vasos de modo que cada una de las puntas aplicadoras 46 pueda penetrar en un vaso correspondiente. - - - - -

20. El portamuestras también tiene una artesa 72 de enjuagado y una artesa 74 de sacante para aclarar y secar los aplicadores. - - - - -

Con referencia a las Figuras 5A y 5B, la placa 80 de temperatura controlada se utiliza en lugar de un portamembranas 14 cuando se desea un medio de gel. La placa está dotada de retenedores 82, 84, 86, 88 que reciben y mantienen

en su lugar una bandeja cuadrada que contiene un gel. Por ejemplo, en la detección de lipoproteínas (Lp), puede utilizarse un gel agarosa. Se hace contacto eléctrico entre el gel y la solución de electrolito por una mecha húmeda a través de rebajes 90, 92 de mecha. Se bombea un líquido de temperatura controlada desde un suministro 99 en la entrada 100 de la placa. Después el líquido pasa por el canal 98 de la placa, sale por la salida 102 y vuelve al suministro 99. - - - - -

Con referencia a la Figura 8 la placa 80 de temperatura controlada se ilustra colocada dentro del depósito 10. Una bandeja cuadrada 103 que contiene un gel 104 está colocada sobre la placa 80 y se mantiene en posición fija por retenedores 82, 84. La bandeja 103 es preferentemente de un material que es un aislante eléctrico y buen conductor térmico. Adicionalmente, la bandeja debe ser inerte frente al electrolito. Dado que la placa está dotada para recibir una bandeja cuadrada, es posible un giro en 90° de los medios de gel. Así se obtiene una mayor resolución realizando dos migraciones ortogonales sobre el gel 104 girando la bandeja en 90° después de la primera migración. - - - - -

Se hace contacto con la solución de electrolito por mechas 106, 108 que descansan sobre el borde del gel y pasan hacia abajo a través de rebajes 90, 92 en el electrolito. El depósito 10 tiene elementos 110 y 111 de retención de mecha para retener el extremo inferior de cada mecha en su sitio dentro de la solución de electrolito. Los elementos retened

res de mecha impiden que las mechas salgan del gel y alinean las mechas de modo que hagan contacto con el gel 104 de manera uniforme a través de su superficie. La alineación de las mechas impide que tenga lugar un gradiente de contacto. Las mechas 104, 103 pueden ser, por ejemplo, de papel filtrante o de esponja de plástico. - - - - -

9. Durante el proceso de electroforesis, la corriente eléctrica que fluye a través del gel 104 hace que se disipe el calor en el gel. La convección térmica en el gel tiende a ensanchar las bandas y provoca errores. Se alivia este ensanchamiento de las bandas haciendo pasar un líquido a través del aparato 80 que tiene una temperatura inferior a la temperatura ambiente. Para algunas mediciones, por ejemplo, se ha encontrado apropiada una temperatura de placa de 4°C.

10. En el proceso de detección de isoenzimas es corriente calentar el gel aproximadamente a 37°C después de apagada la corriente de electroforesis y se añaden productos químicos al gel que reaccionan únicamente con el enzima específico que se busca. Esta invención permite que tenga lugar todo el proceso de detección de isoenzimas mientras que la bandeja del gel permanece en la placa 80. Durante la etapa de migración electroforética se hace pasar un líquido a temperatura inferior a la temperatura ambiente a través de la placa 80. Más adelante, una vez desconectada la electricidad, se hace pasar un líquido a una temperatura superior a la temperatura ambiente a través de la placa 80 para mejorar la detección del enzima deseado. - - - - -

15.

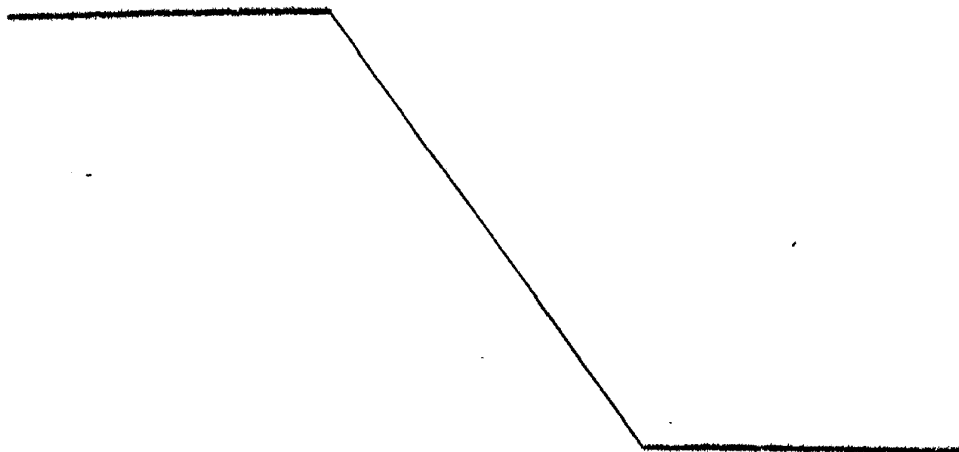
20.

25.

5. Con referencia a la Figura 9, se ilustra una vista superior de la capa 12 con recortes que ilustran los conectores macho y hembra 11, 13. De esta forma pueden conectarse eléctricamente aparatos similares introduciendo los machos 11 de un aparato en los receptáculos 13 de un aparato adyacente. - - - - -

10. En la Figura 10, la muestra 109 ilustra la configuración de las muestras sobre la membrana 16 cuando se aplican simultáneamente. La muestra 112 ilustra como se orientarán las muestras si se avanza el aplicador después de apretar cada pulsador sucesivo de aplicador. Las perforaciones 113 de la membrana están en cooperación con dientes 15 del portamembranas 14. - - - - -

15. A los efectos consiguientes se declaran de novedad y propiedad para España, sus territorios y plazas de soberanía, las reivindicaciones que siguen. - - - - -



REIVINDICACIONES

1.- Perfeccionamientos en los aparatos de electroforesis, caracterizados porque el aparato comprende: - - - -

un depósito (10); - - - - -

5. medios (14, 80, 103) para retener un medio (16, 104) de soporte de muestras; - - - - -

unos medios aplicadores (30) de muestras múltiples, que incluyen aplicadores (39) de muestras múltiples accionables individualmente con puntas (46) para retener muestras fluidas que se han de analizar; - - - - -

10. una tapa (12) para dicho depósito adaptada para recibir dichos puntos aplicadores a través de aberturas correspondientes (56); y - - - - -

15. medios (40, 45) que actúan conjuntamente con dichos aplicadores de muestras múltiples para liberarlos simultáneamente a fin de permitir que dichos aplicadores caigan dentro de dicho depósito y hagan contacto con dicho medio de soporte de muestra. - - - - -

20. 2.- Perfeccionamientos según la reivindicación 1, caracterizados porque dichos medios que actúan conjuntamente incluyen medios (45) de retención de resorte múltiple para mantener cada uno de dichos aplicadores (39) bajo tensión de



resorte en una posición retraida. - - - - -

5. 3.- Perfeccionamientos según la reivindicación 2, caracterizados porque dichos medios que actúan conjuntamente incluyen al menos un pulsador (40) de liberación adaptado para actuar conjuntamente con una pluralidad de dichos medios (45) de retención de resorte para liberar simultáneamente dichos aplicadores (39) al ser apretado. - - - - -

10. 4.- Perfeccionamientos según la reivindicación 3, caracterizados porque dichos aplicadores (39) están adaptados cada uno para apretar individualmente a fin de apretar los medios asociados (45) de retención de resorte para llevar la punta aplicadora (46) en contacto con dicho medio de soporte. - - - - -

15. 5.- Perfeccionamientos según la reivindicación 1, caracterizados porque dicha tapa (12) tiene un número de ranuras (56) practicadas en la misma para recibir dichas puntas aplicadoras, y porque comprende además pequeños agujeros (54) para recibir una clavija (33) de registro de dichos medios aplicadores (30) a fin de poner dichas puntas aplicadoras (46) en registro con una ranura (56) correspondiente a uno de dichos agujeros pequeños (54). - - - - -

20. 25. 6.- Perfeccionamientos según la reivindicación 1, caracterizados porque el aparato comprende además un porta-muestras (60) que incluye una pluralidad de filas de vasos (70) de muestra, adaptados para contener fluido, y un número


5. de agujeros (68) de registro que corresponden a cada fila y que están adaptados para actuar conjuntamente con una clavija (38) de dichos medios aplicadores (30), con lo que pueden colocarse dichos medios aplicadores en registro con una de dichas filas a fin de permitir la transferencia capilar simultánea de fluido de dichos vasos (70) a dichas puntas aplicadoras (46). - - - - -

10. 7.- Perfeccionamientos según la reivindicación 6, caracterizados porque dicho portamuestras (60) comprende además una artesa (72) de aclarado, una artesa (74) de secado y agujeros (68) de registro correspondientes para las mismas.-

15. 8.- Perfeccionamientos según la reivindicación 1, caracterizados porque dichos medios para retener un medio de soporte de muestra comprenden un elemento (14) elástico unitario y substancialmente con forma de U que tiene dientes salientes (18) adaptados para cooperar con perforaciones (113) del medio (16). - - - - -

20. 9.- Perfeccionamientos según la reivindicación 1, caracterizados porque dichos medios para retener un medio de soporte de muestra comprenden una placa (80) de temperatura controlada que tiene una superficie plana para soportar una bandeja cuadrada (103) que contiene un medio (104) de soporte de muestras y medios retenedores (82, 84, 86, 88) para retener dicha bandeja en posiciones primera y segunda mutuamente ortogonales. - - - - -

25.



5. 10.- Perfeccionamientos según la reivindicación 9, caracterizados porque dicho depósito (10) comprende además medios retenedores (110, 111) en sus lados interiores para retener los primeros extremos de unas mechas (106, 108) adaptadas para hacer contacto con dicho medio y un electrolito en dicho depósito. - - - - -

10. 11.- Perfeccionamientos según la reivindicación 1, caracterizados porque dicha tapa (12) incluye primeros conectores eléctricos (11) adaptados para recibir conectadoras correspondientes de una fuente de energía eléctrica externa; y segundos conectores eléctricos (13) adaptados para recibir conectadoras correspondientes de otro aparato colocado lado a lado con dicho depósito de electroforesis. - - - - -

15. 12.- "PERFECCIONAMIENTOS EN LOS APARATOS DE ELECTROFORESIS". - - - - -

Todo ello conforme se describe y reivindica en la presente memoria que consta de dieciséis hojas foliadas y mecanografiadas por una sola de sus caras y de diez figuras que la ilustran.

MADRID 2 3 NOV. 1977

P. A. M. CURELL SUÑOL



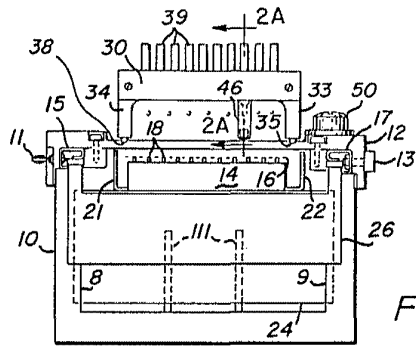


Fig. 1

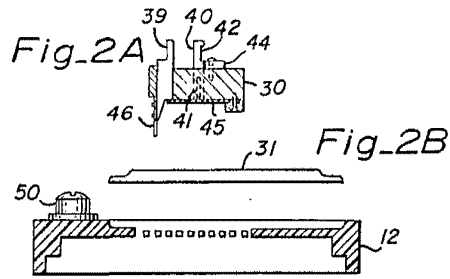


Fig. 2A

Fig. 2B

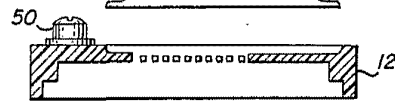


Fig. 2C

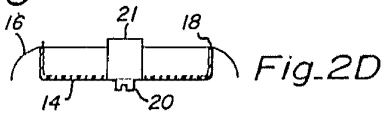


Fig. 2D

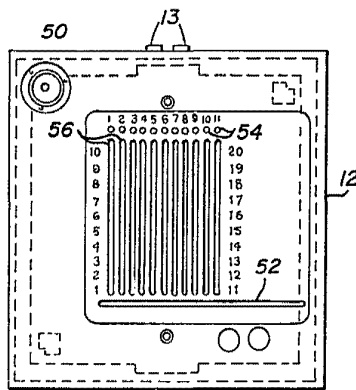


Fig. 3

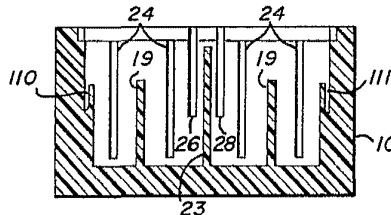


Fig. 2E

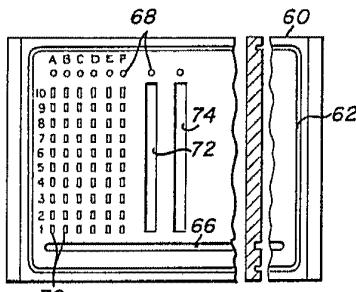


Fig. 4A

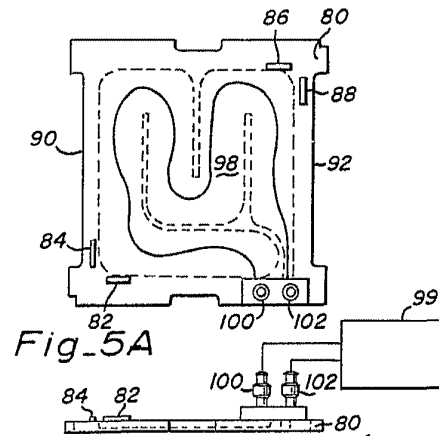


Fig. 5A

Fig. 5B

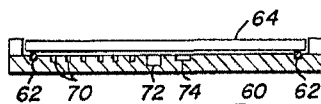


Fig. 4B

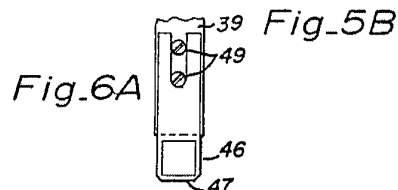


Fig. 6A

Fig. 6B

MAR 27 1977

M. A. M. CIBEL SUÑOL

Dewey

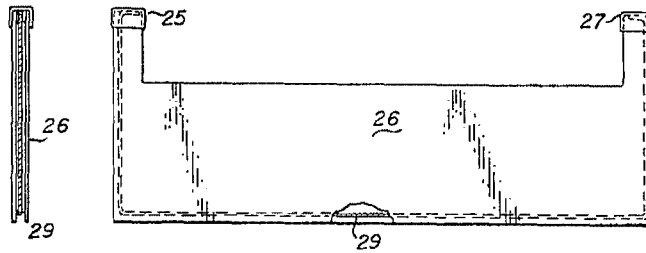


Fig. 7B

Fig. 7A

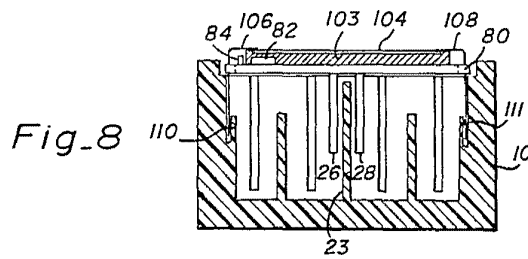


Fig. 8

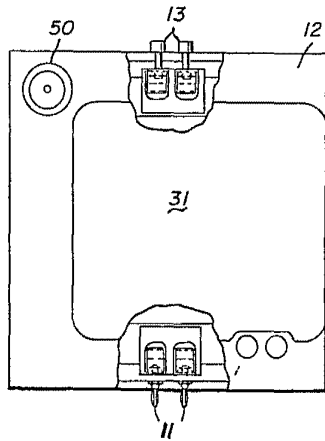


Fig. 9

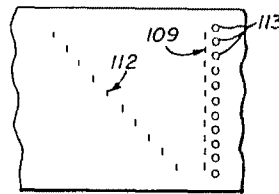


Fig. 10

MADRID 23 NOV. 1977

A. M. ESPILL SUÑOL