(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **1 081 906**

(21) Número de solicitud: 201330548

(51) Int. Cl.:

B01J 35/00 (2006.01)

(12) SOLICITUD DE MODELO DE UTILIDAD U

(22) Fecha de presentación:

08.05.2013

(43) Fecha de publicación de la solicitud:

11.06.2013

(71) Solicitantes:

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC) (100.0%)
AVDA. MARIA LUISA S/N, PALACIO-PABELLÓN DE PERÚ
41013 SEVILLA ES

(72) Inventor/es:

CÁRDENAS CÁRDENAS, Jesús y
RÍOS SÁNCHEZ, Rosa María

(74) Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

(54) Título: **SOPORTE PARA INMUNOFLUORESCENCIAS**

ES 1 081 906 U

DESCRIPCIÓN

Soporte para inmunofluorescencias

SECTOR Y OBJETO DE LA INVENCIÓN

El campo de aplicación de la invención se encuentra en el sector de la investigación y de todos aquellos laboratorios que utilicen técnicas de inmunofluorescencia para cribado (screening) de compuestos, detección molecular etc.

La invención se refiere a un soporte que facilita la realización de inmunofluorescencias de tejidos o células cultivadas sobre cubreobjetos, y que permite reducir notablemente el gasto de anticuerpos necesarios.

ESTADO DE LA TÉCNICA

La inmunofluorescencia es una técnica que emplea anticuerpos conjugados a fluorocromos para localizar antígenos determinados, de forma que se pueden identificar diferentes estructuras a nivel tisular, o determinados orgánulos o estructuras a nivel celular.

Actualmente para realizar inmunofluorescencias y debido a que no existe un dispositivo exclusivo para ello se usan varios métodos:

1) Los cubreobjetos se colocan por separado en placas multipocillos, y ahí es donde se realiza la incubación y los lavados. Este método presenta los siguientes problemas: a) uso excesivo de anticuerpos; b) posibilidad de errores; c) posibilidad de contaminaciones, d) evaporación; e) tener que usar otro soporte para realizar los lavados; f) dificultad a la hora de manipular los cubreobjetos, que por tensión superficial se adhieren al fondo del pocillo; g) Los cubreobjetos se confunden con el fondo del pocillo h) deterioro del plástico de la placa multipocillo.

2) La incubación con los anticuerpos se realiza dentro de placas de petri a las que se le colocan en el fondo un trozo de parafilm y encima del cual se depositan los cubreobjetos. Este método presenta los siguientes problemas: a) consumo de parafilm en cada inmunofluorescencia; b) evaporación elevada; c) Los lavados se deben realizar en otro soporte distinto; d) dificultad en el manejo de los cubreobjetos; e) deterioro del plástico de la placa de Petri.

En el modelo de utilidad español publicado con el nº 1042388 se presenta un soporte alveolar para muestras de análisis y la patente española publicada con el nº 2370165 hace referencia a una bandeja con protuberancias. Ninguno de estos dispositivos sirve para el objetivo que se pretende con el soporte objeto de la presente invención.

EXPLICACIÓN DE LA INVENCIÓN

Constituye el objeto de la presente invención un soporte para inmunofluorescencias que comprende una base, cuatro tabiques laterales y una tapa que encaja por medio de dispositivos de cierre en la base. La base contiene:

- entre 1 y 3 zonas, estando ubicadas en cada una de dichas zonas una serie de entre 5 y 30 pedestales dónde se colocarán los cubreobjetos y habilitándose una subzona adyacente a cada pedestal que permite la identificación de los mismos.

- entre 2 y 6 pocillos situados en un lateral de las zonas dónde están ubicados los pedestales y separados los pocillos de dichas zonas mediante tabiques, conteniendo cada pocillo entre 10 y 60 hendiduras y estando destinados los referidos pocillos a contener la solución dónde se colocan los cubreobjetos verticalmente para realizar los lavados.

En sucesivas formas preferentes de realización del soporte objeto de la invención:

- la base tiene un tamaño comprendido entre 250 y 750 cm^2 con un grosor de entre 5 mm 15 mm y una geometría que se selecciona entre rectangular, circular, romboidal o trapezoidal.

- los tabiques laterales de la base tienen una altura comprendida entre 2,5 y 5 cm y los tabiques que separan las zonas con pedestales de los pocillos tienen una altura comprendida entre 1,5 cm y 4cm.

- los pedestales tienen una geometría cilíndrica o prismática con un diámetro de la base (de la circunferencia circunscrita en el caso de geometría prismática) comprendido entre 5 mm y 10 mm y una altura comprendida entre 0,5 cm y 1,5 cm, pudiendo estar dispuestos en alineación o al tresbolillo. La identificación de los pedestales en las subzonas adyacentes se efectúa mediante la inscripción de números de orden.

- los pocillos tienen una profundidad comprendida entre 0,5 cm y 2,5 cm.

Opcionalmente, la base puede contener un pocillo adicional localizado de forma que limita tanto con las zonas de pedestales como con los pocillos y que tiene por objeto facilitar el manejo de los cubreobjetos.

La base, los pedestales y la tapa se fabrican en cualquier material inalterable frente a los reactivos utilizados en inmunofluorescencia y de fácil lavado, preferentemente metacrilato, teflón o polipropileno. El fondo de la base es preferentemente de color oscuro.

En una realización particular, la base y la tapa están unidas por uno de los lados por medio de bisagras.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

En la realización de inmunofluorescencias, las células o el tejido se colocan sobre un cubreobjetos y se incuban con los anticuerpos, y es en este paso donde el objeto de la presente invención juega un papel muy importante. Sirve de soporte para ir ordenando los cubreobjetos y mantenerlos en tampón antes de comenzar el experimento. Dispone de una serie de sopor-tes a modo de pequeños pedestales donde se colocan los cubreobjetos y sobre ellos se aplica el volumen justo de tampón más anticuerpos que cubra todo la superficie del cubreobjetos. Al cerrar la tapa se mantiene una cámara húmeda que impide la evaporación. Tras el tiempo de incubación, los lavados se pueden hacer de forma ordenada en los pocillos situados a un lado.

Respecto a la realización de los ensayos de inmunofluorescencia en placas multipocillos, el soporte objeto de la presente invención permite superar los inconvenientes señalados en el apartado de estado de la técnica:

a) La cantidad de anticuerpo se minimiza a la superficie del cubreobjetos y no a la superficie en la que el cubreobjetos está depositado.

b) Existe muy poca posibilidad de error ya que cada cubreobjetos se coloca en un pedestal numerado y en los lavados se sitúa en ranuras contiguas al mismo.

c) No hay posibilidad de contaminaciones, ya que solo se aplican anticuerpos al cubreobjetos y no a otra superficie como en el caso de usar placas multipocillos, ya que para asegurarse de cubrir toda la superficie del cubreobjetos hay que cubrir la superficie del pocillo en el que se coloque, y al reutilizar el soporte pueden quedar restos de anticuerpos de inmunofluorescencias anteriores.

d) los pocillos llenos de tampón y el cierre de la tapa crean una cámara húmeda que minimiza la evaporación del tampón que se añade a cada cubreobjetos, volumen que normalmente ronda los 50 microlitros.

e) los lavados se pueden realizar cómodamente en los pocillos situados al lado de cada hilera de pedestales. Son dos por cada hilera para realizar los dos lavados necesarios tras la incubación con los anticuerpos primarios y tras los secundarios. Tras la incubación y eliminación del tampón colocado sobre cada cubreobjetos se realizan los dos lavados, colocándolos en las ranuras del primer pocillo y tras un tiempo determinado se repite lo mismo en el siguiente pocillo. A su vez también sirven de almacenamiento ordenado de los cubreobjetos previos a una inmunofluorescencia en experimentos de cinética en los que los cubreobjetos van siendo fijados de forma espaciada en el tiempo.

f) La manipulación de los cubreobjetos no presenta ninguna dificultad, pues al sobresalir de los pedestales se pueden coger con una pinza fácilmente, y de igual forma en las ranuras de los pocillos, no se adhieren en ningún momento por tensión superficial y tampoco entre ellos, pues en todo momento están separados.

g) a diferencia de la placa multipocillo que es transparente, el soporte objeto de invención, presenta en una de sus realizaciones preferentes un fondo oscuro, que permite diferenciar claramente los cubreobjetos

h) a diferencia de las placas multipocillo que se pueden deteriorar con el uso, la caja objeto de invención permanece inalterable.

Respecto al procedimiento en placas de Petri, con el soporte objeto de la invención se evitan también los problemas indicados en el apartado de estado de la técnica:

a) al estar los cubreobjetos elevados en un pedestal no hace falta usar parafilm, que en el caso de usar placas de Petri se usa para que el volumen de tampón que se añade a cada cubreobjetos quede concentrado en cada uno y no difunda hacia fuera, dejando el cubreobjetos casi seco.

b) la evaporación en el caso de las placas de Petri es elevada; en el caso del soporte objeto de la invención es mínima.

c) toda la operación se realiza en el mismo soporte.

d) el manejo de los cubreobjetos no presenta dificultad ninguna, al no estar colocados en una superficie plana que cubra toda la superficie del mismo si no en pedestales elevados.

e) a diferencia de las cajas de Petri de plástico que se deterioran con los usos, el soporte objeto de la invención permanece inalterable.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: a) vista en alzado del soporte para inmunofluorescencias; b) vista en planta del soporte para inmunofluorescencias.

Figura 2: vista en perspectiva de un modo de realización preferente del soporte para inmunofluorescencias.

MODO DE REALIZACIÓN DE LA INVENCIÓN

En la figura 1 se representan las vistas en alzado y planta y perfil del objeto de invención. Tiene geometría rectangular y unas dimensiones de 25cm por 20 cm.

El soporte está constituido por una caja formada por una base (1) cuyo fondo (2) es oscuro, cuatro tabiques laterales (3) y una tapa (4) que encaja por medio de cuatro pequeños cilindros (5). Interiormente consta de dos zonas (6) donde se encuentran una hilera de 10 pedestales (7) en cada una de las zonas (6) donde se colocarán los cubreobjetos, y al lado una zona destinada a los números (8) que permiten identificar cada pedestal. Al lado de cada zona de pedestales (7), se ubican dos pocillos (9) delimitados por tabiques delgados (10) que contienen pequeñas hendiduras (11). Los pocillos (9) están destinados a contener una solución donde se colocarán los cubreobjetos verticalmente para realizar los lavados. Un tabique delgado (10) separa una zona de pedestales (6) y uno de los pocillos (9).

El soporte está fabricado en metacrilato transparente y la tapa (4) se puede desvincular completamente de la base (1).

En la figura 2 se muestra una perspectiva de un modo de realización particular del soporte objeto de la presente invención, en el cual se ha dispuesto un pocillo adicional (12) que es de utilidad para diversas operaciones relacionadas con el manejo de los cubreobjetos.

La realización de ensayos de inmunofluorescencia haciendo uso del soporte objeto de la presente invención se resume a continuación: una vez fijado el tejido o la monocapa de células en los cubreobjetos, éstos se colocan en los pedestales. Sobre cada cubreobjetos se añade un volumen de anticuerpos primarios suficiente para cubrirlo. Posteriormente se colocan los cubreobjetos en las ranuras del primer pocillo para hacer el primer lavado. Luego se hace lo mismo en el siguiente pocillo, para posteriormente volver a colocarlas en los pedestales y añadir los anticuerpos secundarios. A continuación se repiten los lavados colocando otra vez los cubreobjetos en las ranuras y se finaliza la inmunofluorescencia.

REIVINDICACIONES

1.- Soporte para inmunofluorescencias que comprende una base, cuatro tabiques laterales y una tapa que encaja por medio de dispositivos de cierre en la base, caracterizado porque la base contiene:

- entre 1 y 3 zonas, estando ubicadas en cada una de dichas zonas una serie de entre 5 y 30 pedestales dónde se colocarán los cubreobjetos y habilitándose una subzona adyacente a cada pedestal que permite la identificación de los mismos.

- entre 2 y 6 pocillos situados en un lateral de las zonas dónde están ubicados los pedestales y separados los pocillos de dichas zonas mediante tabiques, conteniendo cada pocillo entre 10 y 60 hendiduras y estando destinados los referidos pocillos a contener la solución dónde se colocan los cubreobjetos verticalmente para realizar los lavados.

2.- Soporte para inmunofluorescencias según la reivindicación 1, caracterizado porque la base tiene un tamaño comprendido entre 250 y 750 cm^2 con un grosor de entre 5 mm y 15 mm y una geometría que se selecciona entre rectangular, circular, romboidal o trapezoidal.

3.- Soporte para inmunofluorescencias según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado porque los tabiques laterales de la base tienen una altura comprendida entre 2,5 y 5 cm y los tabiques que separan las zonas con pedestales de los pocillos tienen una altura comprendida entre 1,5 cm y 4 cm.

4.- Soporte para inmunofluorescencias según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque los pedestales tienen una geometría que se selecciona entre cilíndrica o prismática.

5.- Soporte para inmunofluorescencias según la reivindicación 4, caracterizado porque los pedestales tienen geometría cilíndrica con un diámetro comprendido entre 0,5 cm y 1 cm y una altura comprendida entre 0,5 cm y 1,5 cm.

6.- Soporte para inmunofluorescencias según la reivindicación 4, caracterizado porque los pedestales tienen geometría prismática con un diámetro de la circunferencia circunscrita a la base comprendido entre 0,5 y 1 cm y una altura comprendida entre 0,5 cm y 1,5 cm.

7.- Soporte para inmunofluorescencias según una cualquiera de las reivindicaciones 5 o 6, caracterizado porque los pedestales están dispuestos en alineación.

8.- Soporte para inmunofluorescencias según una cualquiera de las reivindicaciones 5 o 6, caracterizado porque los pedestales estás dispuestos al tresbolillo

9.- Soporte para inmunofluorescencias según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque la identificación de los pedestales en las subzonas adyacentes se efectúa mediante la inscripción de números de orden.

10.- Soporte para inmunofluorescencias según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado porque los pocillos tienen una profundidad comprendida entre 0,5 cm y 2,5 cm.

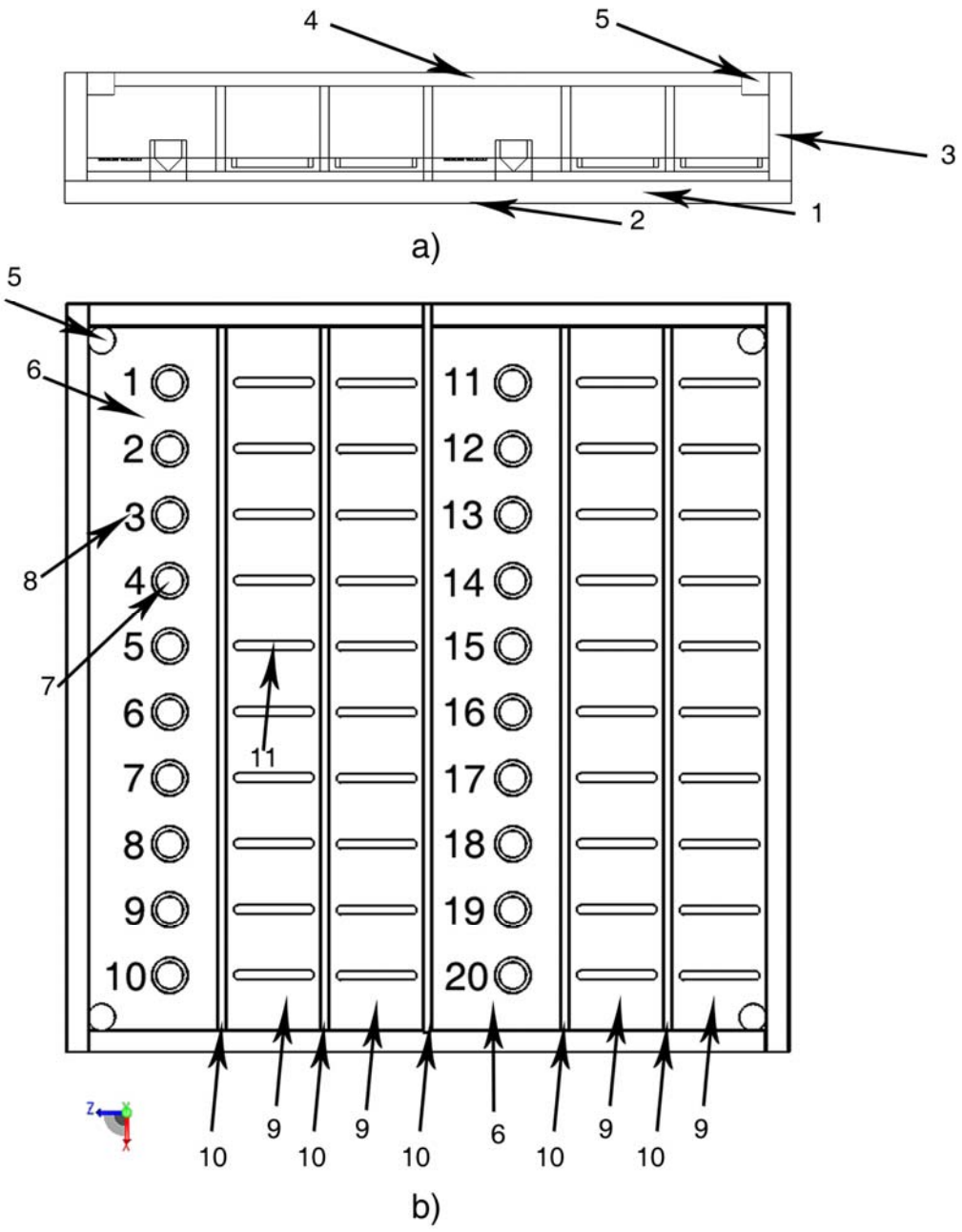
11.- Soporte para inmunofluorescencias según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizado porque la base contiene adicionalmente un pocillo localizado de forma que limita tanto con las zonas con pedestales como con los pocillos y que tiene por objeto facilitar el manejo de los cubreobjetos.

12.- Soporte para inmunofluorescencias según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizado porque la base y la tapa están unidas por uno de los lados mediante bisagras.

13.- Soporte para inmunofluorescencias según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, caracterizado porque la base, los pedestales y la tapa se fabrican en un material inalterable frente a los reactivos utilizados en inmunofluorescencia y de fácil lavado que se selecciona entre metacrilato, teflón o polipropileno.

14.- Soporte para inmunofluorescencias según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, caracterizado porque el fondo de la base es de color oscuro.

Figura 1


4
5
3
2
1
a)
5
6
8
7
11
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
10
9
10
9
10
6
10
9
10
9
b)

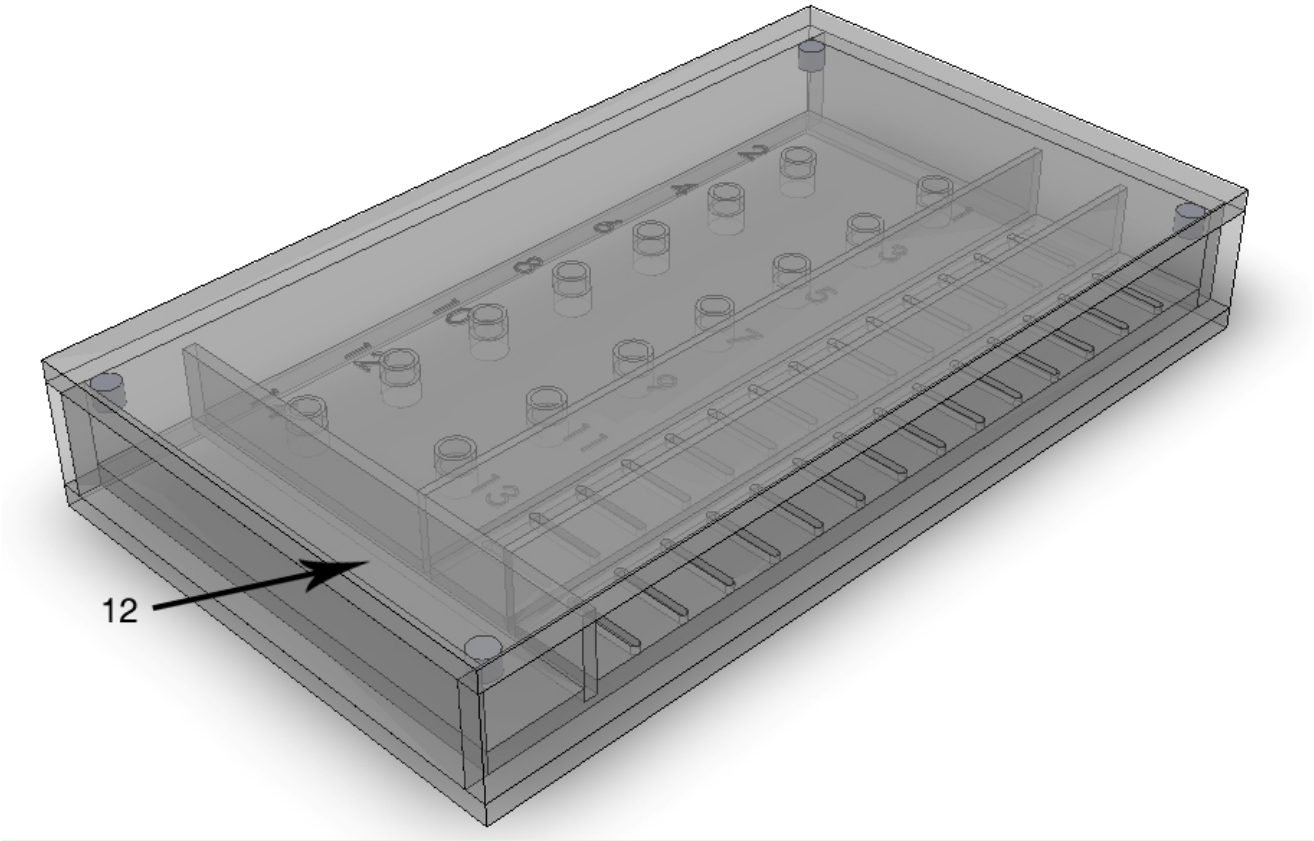



Figura 2