



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105209917 A

(43) 申请公布日 2015. 12. 30

(21) 申请号 201480025572. 3

G01N 33/49(2006. 01)

(22) 申请日 2014. 03. 12

G01N 33/53(2006. 01)

(30) 优先权数据

61/777, 682 2013. 03. 12 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 11. 05

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2014/024684 2014. 03. 12

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/165185 EN 2014. 10. 09

(71) 申请人 密歇根大学董事会

地址 美国密歇根州

(72) 发明人 S·N·古纳瓦德纳 C·加斯珀

小詹姆斯·R·贝克

P·R·勒鲁埃伊 H·N·昌

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

代理人 刘磊

(51) Int. Cl.

G01N 33/561(2006. 01)

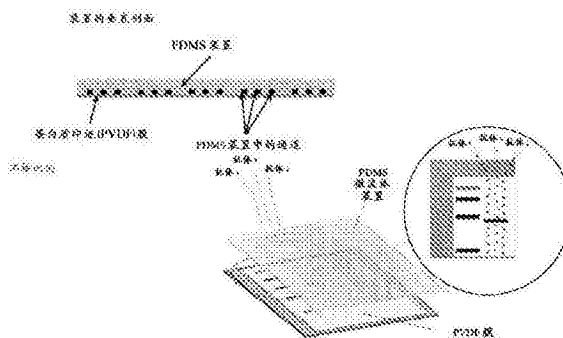
权利要求书2页 说明书13页 附图3页

(54) 发明名称

用于免疫印迹的微流体装置

(57) 摘要

本发明提供用于在免疫印迹应用中使用的微流体装置、系统和方法。具体而言,本文提供的装置和方法具有传统蛋白质印迹的优点,同时具有增加的生产量和多重能力以及减少的时间、样品和试剂需求。



1. 一种微流体免疫印迹装置,其包括平的膜接触表面和多个非连接的平行微流体通道,其中所述微流体通道的整个长度对所述膜接触表面是开放的。

2. 根据权利要求 1 所述的微流体免疫印迹装置,其中所述微流体通道在空间上被分成两个或更多个通道组。

3. 根据权利要求 2 所述的微流体免疫印迹装置,其中所述两个或更多个通道组的每个包括 2-20 个微流体通道。

4. 根据权利要求 3 所述的微流体免疫印迹装置,其中分离微流体通道与通道组的距离小于通道组之间的距离。

5. 根据权利要求 1 所述的微流体免疫印迹装置,其中每个所述微流体通道包括在所述微流体通道的一端的储蓄池。

6. 根据权利要求 1 所述的微流体免疫印迹装置,其中每个所述微流体通道是 100-200  $\mu\text{m}$  宽。

7. 根据权利要求 6 所述的微流体免疫印迹装置,其中每个所述微流体通道是 140-160  $\mu\text{m}$  宽。

7. 根据权利要求 1 所述的微流体免疫印迹装置,其中每个所述微流体通道是 50-150  $\mu\text{m}$  深。

8. 根据权利要求 1 所述的微流体免疫印迹装置,其中每个所述微流体通道是 90-110  $\mu\text{m}$  深。

9. 根据权利要求 1 所述的微流体免疫印迹装置,其中所述装置包括聚二甲基硅氧烷 (PDMS)。

10. 根据权利要求 1 所述的微流体免疫印迹装置,其中所述装置基本由聚二甲基硅氧烷 (PDMS) 组成。

11. 一种免疫印迹方法,其包括使用根据权利要求 1-10 中的一项所述的装置将抗体溶液施用于膜。

12. 一种系统,其包括根据权利要求 1-10 中的一项所述的装置和膜。

13. 根据权利要求 12 所述的系统,其还包括在所述装置与所述膜之间的激活溶液。

14. 根据权利要求 13 所述的系统,其中所述激活溶液包含 Tween-20 和 BSA。

15. 根据权利要求 14 所述的系统,其中所述激活溶液包含 0.05-0.15% 的 Tween-20 和 0.05-0.15% 的 BSA。

16. 根据权利要求 15 所述的系统,其中所述激活溶液包含 0.1% 的 Tween-20 和 0.1% 的 BSA。

17. 根据权利要求 12 所述的系统,其中所述膜包括膜硝化纤维素或聚偏二氟乙烯 (PVDF)。

18. 根据权利要求 12 所述的系统,其中所述膜包括在所述膜上或在所述膜内的肽、多肽或蛋白质。

19. 根据权利要求 12 所述的系统,其还包括在所述微流体通道中的一种或多种含抗体溶液。

20. 根据权利要求 19 所述的系统,其中通道组的每个微流体通道包括不同的含抗体溶液。

21. 根据权利要求 20 所述的系统,其中每个通道组包括含抗体溶液的相同的组合。
22. 根据权利要求 19 所述的系统,其中每个微流体通道包括不同的含抗体溶液。
23. 一种免疫印迹方法,其包括使用根据权利要求 12-22 中的一项所述的系统将抗体溶液施用于膜。
24. 一种免疫印迹方法,其包括:
  - (a) 将蛋白质从样品转移至膜上;
  - (b) 将微流体免疫印迹装置的膜接触面放置在所述膜上;
  - (c) 将激活缓冲液注射至所述装置的微流体通道中;
  - (d) 将一抗溶液注射至所述装置的所述微流体通道中;
  - (e) 检测所述抗体溶液中的抗体与所述蛋白质的结合。

## 用于免疫印迹的微流体装置

[0001] 本申请要求在 2013 年 3 月 12 日提交的美国临时专利申请 61/777,682 的优先权, 所述申请以整体引用的方式并入本文。

[0002] 领域

[0003] 本发明提供用于在免疫印迹应用中使用的微流体装置、系统和方法。具体而言, 本文提供的装置和方法具有传统蛋白质印迹的优点, 同时具有增加的生产量和多重能力以及减少的时间、样品和试剂需求。

[0004] 背景

[0005] 传统蛋白质印迹分析 (或免疫印迹) 用于检测细胞、组织、器官、体液等中的特定的蛋白质。该技术是生物化学和分子生物学的支柱。样品中的蛋白质通过凝胶电泳 (例如, SDS-PAGE) 分离并且然后从凝胶转移到膜 (例如, 硝化纤维素或 PVDF)。然后将膜用对靶蛋白特异的抗体染色。虽然可靠地产生有用的信息, 但所述技术: 耗时、需要专门技术、试剂密集型、有限的生产量并且不太适用于多重性。需要的是提供传统蛋白质印迹的优点, 同时具有增加的生产量、多重能力和减少的试剂使用的技术。

[0006] 发明概述

[0007] 本发明提供用于在免疫印迹应用中使用的微流体装置、系统和方法。具体而言, 本文提供的装置和方法具有传统蛋白质印迹的优点, 同时具有增加的生产量和多重能力以及减少的时间、样品和试剂需求。

[0008] 在一些实施方案中, 本发明提供一种微流体免疫印迹装置, 其包括平的膜接触表面和多个非连接的平行微流体通道, 其中所述微流体通道的长度对膜接触表面是开放的。在一些实施方案中, 微流体通道在空间上被分成两个或更多个通道组。在一些实施方案中, 两个或更多个通道组的每个包括 2-20 微流体通道。在一些实施方案中, 分离微流体通道与通道组的距离小于通道组之间的距离。在一些实施方案中, 微流体通道 (例如, 微流体通道的每个) 包括在微流体通道的一端的储蓄池。在一些实施方案中, 微流体通道 (例如, 微流体通道的每个) 包括在微流体通道的两端的储蓄池。在一些实施方案中, 每个微流体通道是 50-300  $\mu\text{m}$  宽。在一些实施方案中, 每个微流体通道是 100-200  $\mu\text{m}$  宽。在一些实施方案中, 每个微流体通道是 140-160  $\mu\text{m}$  宽。在一些实施方案中, 每个微流体通道是 30-200  $\mu\text{m}$  深。在一些实施方案中, 每个微流体通道是 50-150  $\mu\text{m}$  深。在一些实施方案中, 每个微流体通道是 90-110  $\mu\text{m}$  深。在一些实施方案中, 微流体通道的宽度与深度的比小于 10:1 (例如, <9:1、<8:1、<7:1、<6:1、<5:1、<4:1、<3:1、<2:1)。在一些实施方案中, 微流体通道的宽度与深度的比在 3:1 至 1:3 之间 (例如, 2:1 至 1:2)。在一些实施方案中, 微流体通道的宽度与深度的比是 9:1、8:1、7:1、6:1、5:1、4:1、3:1、2:1、1.5:1、1:1、1:1.5、1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7、1:8 或 1:9。在一些实施方案中, 微流体通道的宽度与深度的比在 3:1 至 1:3 之间 (例如, 2:1 至 1:2)。在一些实施方案中, 所述装置包括聚二甲基硅氧烷 (PDMS)。在一些实施方案中, 所述装置基本由聚二甲基硅氧烷 (PDMS) 组成。在一些实施方案中, 本发明提供免疫印迹的方法, 所述方法包括使用本发明的装置将抗体溶液施用于膜。

[0009] 在一些实施方案中, 本发明提供包括本发明的装置和膜的系统 (例如, 分析)。在

一些实施方案中,激活溶液被定位或放置在所述的装置和所述的膜之间。在一些实施方案中,所述激活溶液包含聚山梨醇酯-20(Tween-20)和BSA。在一些实施方案中,所述激活溶液包含0.01-0.5%的Tween-20和0.01-0.5%的BSA。在一些实施方案中,所述激活溶液包含0.05-0.15%的Tween-20和0.05-0.15%的BSA。在一些实施方案中,所述激活溶液包含0.1%的Tween-20和0.1%的BSA。在一些实施方案中,所述膜包含膜硝化纤维素或聚偏二氟乙烯(PVDF)。在一些实施方案中,所述膜包括在膜上或在膜内的肽、多肽或蛋白质。在一些实施方案中,系统还包括在微流体通道内的一种或多种含抗体溶液。在一些实施方案中,通道组的每个微流体通道包括不同的含抗体溶液。在一些实施方案中,每个通道组包括含抗体溶液的相同的组合。在一些实施方案中,每个微流体通道包括不同的含抗体溶液。在一些实施方案中,本发明提供免疫印迹的方法,所述方法包括使用本发明的系统将抗体溶液施用于膜。

[0010] 在一些实施方案中,本发明提供免疫印迹的方法,其包括:(a)将蛋白质从样品转移至膜上;(b)将微流体免疫印迹装置的膜接触面放置在膜上;(c)将激活缓冲液引入(例如,注射)所述装置的微流体通道中;(d)将一抗溶液引入(例如,注射)所述装置的微流体通道中;并且(e)检测所述抗体溶液中的抗体与所述蛋白质的结合。

[0011] 附图简述

[0012] 图1示出微流体免疫印迹装置和与膜的对接的示意图。三个微流体通道覆盖在每个样品泳道上,可用于探测每个泳道三种不同的蛋白质。

[0013] 图2示出在临床PBMC样品中的抗体稀释液。(A)利用针对RelA/p65的一抗的传统免疫印迹,使用1:500至1:5000的抗体稀释液。(B)使用相同的条件探测RelA/p65的微流体免疫印迹,如展示了相似的信号强度和对同一样品制备若干稀释液的灵活性。

[0014] 图3示出对响应于炎性刺激的STAT3磷酸化作用的检测。(A)RAW264.7细胞裂解液的传统免疫印迹,示出响应于LPS刺激的STAT3的磷酸化作用。(B)在与(A)相同的RAW264.7细胞裂解液上的微流体免疫印迹。所述微流体装置允许在同一样品中同时监测磷酸-STAT3和STAT3而不需要剥离或重新探测PVDF膜。

[0015] 图4示出利用两种不同的化学发光检测形式的MAPK通路的蛋白质免疫印迹。(A)RAW264.7细胞裂解液的传统免疫印迹,有或没有LPS,保持45分钟。使用总ERK作为上样对照,探测膜的磷酸-JNK和磷酸-ERK。使用HRP化学发光技术检测一抗。(B)反映(A)中的条件的微流体免疫印迹。(C)和(D)与(A)和(B)相同,除了它们使用碱性磷酸酶化学发光二抗来进行以检测一抗。

[0016] 定义

[0017] 本文的术语“抗体”以最广泛的意义使用并且具体地涵盖单克隆抗体、多克隆抗体、二聚体、多聚体、多特异性抗体(例如,双特异性抗体)和抗体片段,只要它们展现出期望的生物活性(Miller等(2003) *Jour. of Immunology* 170:4854-4861;其以整体引用的方式并入本文)。抗体可以是鼠的、人的、人源化的、嵌合的或衍生自其他物种。抗体是由免疫系统生成的能够识别并结合特定抗原的蛋白质。(Janeway, C, Travers, P, Walport, M, Shlomchik(2001) *Immuno Biology*, 第5版, Garland Publishing, New York;以整体引用的方式并入本文)。靶抗原通常具有多个结合位点,也称作表位,其由多种抗体上的CDR识别。特异性结合不同表位的每一抗体具有不同结构。因此,一种抗原可具有不止一种的对应抗体。

抗体包括全长免疫球蛋白分子或全长免疫球蛋白分子的免疫活性部分,即包含免疫特异性地结合所感兴趣的靶标抗原或其部分的抗原结合位点的分子,这些靶标包括但不限于癌细胞或产生与自体免疫疾病相关的自身免疫抗体的细胞。免疫球蛋白可以是任何类型(例如,IgG、IgE、IgM、IgD和IgA)、类别(例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)或免疫球蛋白分子的亚类。免疫球蛋白可以来源于任何物种,包括人、鼠或兔源。

[0018] 如本文所用,术语“抗体片段”指全长抗体的一部分,一般是其抗原结合区或可变区。抗体片段的实例包括Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>和Fv片段;双抗体;线性抗体;由Fab表达文库产生的片段、抗独特型(抗-Id)抗体、CDR(互补决定区)以及免疫特异性地结合抗原的任何上述项的表位结合片段。

[0019] 如本文所用,短语“多重的”或语法等效物指所感兴趣的多于一个靶序列的检测、分析或扩增。在一个实施方案中,多重的指>3、>5、>8、>10、>20、>50、>100等。“多重能力”指以多重方式使用的特定设备、试剂、系统、平台、试剂盒等的质量。

[0020] 如本文所用,术语“样品”以其最广泛的意义使用。在某种意义上,其意图包括细胞(例如,人、细菌、酵母和真菌)、有机体、从任何来源获得的试样或培养物,以及生物和环境样品。生物样品可从动物(包括人)获得并且指在其中发现的生物材料或组合物,包括但不限于骨髓、血液、血清、血小板、血浆、组织间液、尿液、脑脊液、核酸、DNA、组织以及其纯化或过滤形式。环境样品包括环境材料如地表物质、土壤、水、晶体和工业样品。然而,这些实例不能理解为限制适用于本发明的样品类型。

[0021] 本发明实施方案详述

[0022] 本发明提供用于在免疫印迹应用中使用的微流体装置、系统和方法。具体而言,本文提供的装置和方法具有传统蛋白质印迹的优点,同时具有增加的生产量和多重能力以及减少的时间、样品和试剂需求。

[0023] 自1979年问世以来,蛋白质免疫印迹已成为分子生物学和临床诊断学中用于分析蛋白质的标准技术(Towbin等1979;其以整体引用的方式并入本文)。虽然传统蛋白质免疫印迹仍为强大的技术,但这种技术具有局限性,包括其缓慢生产量、对于相对大的样品和抗体量的需求和无法同时探测多种蛋白质(Wu等,2007;以整体引用的方式并入本文)。

[0024] 为克服一些早期局限性,已经演化出蛋白质免疫印迹的若干变型,包括允许不同蛋白质的连续检测的膜剥离和重新探测,和荧光二抗的引入,所述荧光二抗可用于增加从样品检测到的不同蛋白质。尽管取得改进,但是这些变型具有其自身的局限性,包括信号缺失和信号可变性。另外,这些变型都没有解决传统免疫印迹所需较大样品和抗体量的问题。

[0025] 微流体技术已应用于分子生物学和临床诊断学。通过微流体提供的小体积和精确的空间控制使其成为对现存的分子生物技术的一个令人兴奋的弥补。Herr小组将微流体技术与传统蛋白质免疫印迹进行了结合(He和Herr 2009, Hughes和Herr 2012,以整体引用的方式并入本文)。虽然取得改进,但这种方法仅可检测单一的蛋白质并且不具有对接现存的免疫印迹平台的灵活性。最近,已开发出使免疫印迹的分离、转移和检测部件整合到单个设备中的微流体装置(Tia等2011;以其整体引用的方式并入本文)。虽然此装置的速度和多重能力显著增强,但利用此类整合的微流体装置探测复杂生物基质中的特定蛋白质的能力仍未得到证明。Pan和同事通过引入基于荧光的微流体装置做了进一步改进,所述装置可检测多种蛋白质并且与现存的蛋白质免疫印迹方法是兼容的(Pan等2010;以整体引用的

方式并入本文)。这些微流体装置都不允许同时探测多种蛋白质并且都不能对接现有的免疫印迹设备和化学发光检测方法。

[0026] 虽然传统蛋白质印迹可产生重要的信息(例如,关于生物系统(例如,人)与外部刺激(例如,抗炎药)之间的相互作用),但就试剂和时间而言,它们是昂贵的。在某些实施方案中,本发明提供如下装置和方法,与传统蛋白质印迹相比,所述装置和方法提供类似和/或较大的信息量,但具有降低的试剂和时间消耗以及增加的生产量和多重能力。在一些实施方案中,本发明提供包括被配置来覆盖存在于含蛋白质膜上的泳道的微流体通道组的微流体装置。在各种实施方案中,通过微流体通道内的抗体探测膜上的蛋白质。在一些实施方案中,膜上的单一蛋白质泳道被两个或更多个微流体通道(例如,2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个)覆盖,每个微流体通道含有用于探测蛋白质泳道的不同抗体。

[0027] 在一些实施方案中,本发明提供了与传统免疫印迹相比的许多优点。例如,代替将整个膜与单一类型的一抗孵育,在每个蛋白质泳道的单一微流体通道内提供更小数量的抗体。在其中每个蛋白质泳道提供多个微流体通道的实施方案中,可通过多种不同的抗体同时探测单一的蛋白质泳道。在一些实施方案中,与传统免疫印迹相比,本发明允许采用更多类型的抗体(例如,每个凝胶泳道2...5...10...20或者更多种)、使用更少的试剂(例如,微流体通道对孵育整个膜)、更少的样品(例如,凝胶上的单一泳道对用于每种不同抗体的不同凝胶)和更少的时间(例如,单一的凝胶和膜转移对不同的凝胶和转移)进行探测。在一些实施方案中,从时间的角度来看,在完成一次传统蛋白免疫印迹花费的时间内,本发明的装置和方法可完成3、5、10、20或更多次免疫印迹。在一些实施方案中,从成本的角度来看,本发明的装置和方法可用小于传统蛋白质印迹成本的1%完成免疫印迹。

#### [0028] A. 装置

[0029] 在某些实施方案中,提供包括一个或多个微流体通道(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或更多)的一个或多个组(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或更多)的微流体装置。在一些实施方案中,通道沿装置的平的表面延伸,使得包含在通道内的流体暴露于装置的表面。在一些实施方案中,每个通道包括储蓄池或用于将抗体溶液引入微流体通道内的其他流体引入装置。

[0030] 在一些实施方案中,微流体装置不需要阀、泵送、混合腔室和/或其他对微流体装置是普遍的、但增加装置的成本和其使用复杂性的更复杂元件。在一些实施方案中,微流体装置不需要与凝胶电泳整合以进行免疫印迹。

[0031] 在一些实施方案中,微流体装置包括一组或多组通道,每组包括一个或多个通道。每组被配置来探测蛋白质凝胶上的单一泳道。在一些实施方案中,一组中的每个通道被配置来用不同抗体探测蛋白质泳道。每个通道组可包括相同或不同数量的通道。

[0032] 在一些实施方案中,装置可以具有任何合适的大小和尺寸。在一些实施方案中,装置被配置来配合特定凝胶或膜的尺寸。在一些实施方案中,装置被配置来适用于具有不同大小和/或尺寸的凝胶和膜。在一些实施方案中,装置包括具有在1cm至50cm之间的或更大的尺寸(例如,1cm x 1cm、4cm x 6cm、8cm x 6cm、5cm x 20cm、20cm x 40cm等)的覆盖区(例如,膜接触面)。在一些实施方案中,微流体装置的膜接触面的长度和/或宽度是1cm...2cm...3cm...4cm...5cm...6cm...7cm...8cm...9cm...10cm...11cm...12cm...13cm...14cm...15cm...16cm...17cm...18cm...19cm...20cm...21cm...22cm...23cm...24cm。

.. 25cm... 26cm... 27cm... 28cm... 29cm... 30cm... 31cm... 32cm... 33cm... 34cm... 35cm...  
.. 36cm... 37cm... 38cm... 39cm... 40cm... 41cm... 42cm... 43cm... 44cm... 45cm... 46cm...  
.. 47cm... 48cm... 49cm... 50cm。

[0033] 在一些实施方案中,微流体装置的通道可以具有任何合适的大小和尺寸。在一些实施方案中,通道是如此设定尺寸以允许适当的溶液有效地穿过和 / 或占据微流体通道。在一些实施方案中,通道的长度与装置的长度是成比例的。在一些实施方案中,通道的长度与被配置用于使用的膜和 / 凝胶的长度是成比例的。在一些实施方案中,通道的长度是在 1cm 至 50cm 之间 (例如, 1cm... 2cm... 3cm... 4cm... 5cm... 6cm... 7cm... 8cm... 9cm... 10cm... 11cm... 12cm... 13cm... 14cm... 15cm... 16cm... 17cm... 18cm... 19cm... 20cm... 21cm... 22cm... 23cm... 24cm... 25cm... 26cm... 27cm... 28cm... 29cm... 30cm... 31cm... 32cm... 33cm... 34cm... 35cm... 36cm... 37cm... 38cm... 39cm... 40cm... 41cm... 42cm... 43cm... 44cm... 45cm... 46cm... 47cm... 48cm... 49cm... 50cm)。在一些实施方案中,通道具有适当的宽度和 / 或深度以允许必要的溶液 (例如, 抗体溶液) 流经 / 穿过、占据和 / 或填充通道。在一些实施方案中,优化通道的宽度以便在特定宽度的组中提供所需的通道数。在一些实施方案中,当将通道变窄以使每组容纳更多泳道时,将通道加深以提供必要的通道体积。在一些实施方案中,通道组的宽度在 1mm 至 50cm 的范围内 (例如, 1mm... 2mm... 3mm... 4mm... 5mm... 6mm... 7mm... 8mm... 9mm... 1cm... 2cm... 3cm... 4cm... 5cm... 6cm... 7cm... 8cm... 9cm... 10cm... 11cm... 12cm... 13cm... 14cm... 15cm... 16cm... 17cm... 18cm... 19cm... 20cm... 21cm... 22cm... 23cm... 24cm... 25cm... 26cm... 27cm... 28cm... 29cm... 30cm... 31cm... 32cm... 33cm... 34cm... 35cm... 36cm... 37cm... 38cm... 39cm... 40cm... 41cm... 42cm... 43cm... 44cm... 45cm... 46cm... 47cm... 48cm... 49cm... 50cm)。在一些实施方案中,组宽度被配置来配合凝胶和 / 或膜的泳道宽度。在一些实施方案中,一组微通道包括一个或多个通道 (例如, 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10... 20... 30... 40... 50... 100... 500 等)。在一些实施方案中,每组通道的数量取决于组的宽度、通道之间的间距和通道的宽度 (例如, 通道的宽度可取决于通道内待使用的溶液的类型)。在一些实施方案中,通道的宽度在 50  $\mu\text{m}$  至 500  $\mu\text{m}$  的范围内 (例如, 50  $\mu\text{m}$ 、60  $\mu\text{m}$ 、70  $\mu\text{m}$ 、80  $\mu\text{m}$ 、90  $\mu\text{m}$ 、100  $\mu\text{m}$ 、110  $\mu\text{m}$ 、120  $\mu\text{m}$ 、130  $\mu\text{m}$ 、140  $\mu\text{m}$ 、150  $\mu\text{m}$ 、160  $\mu\text{m}$ 、170  $\mu\text{m}$ 、180  $\mu\text{m}$ 、190  $\mu\text{m}$ 、200  $\mu\text{m}$ ... 250  $\mu\text{m}$ ... 300  $\mu\text{m}$ ... 350  $\mu\text{m}$ ... 400  $\mu\text{m}$ ... 450  $\mu\text{m}$ ... 500  $\mu\text{m}$ )。在一些实施方案中,通道的宽度在 100  $\mu\text{m}$  至 200  $\mu\text{m}$  的范围内 (例如, 125  $\mu\text{m}$  至 175  $\mu\text{m}$ 、140  $\mu\text{m}$  至 160  $\mu\text{m}$ 、约 150  $\mu\text{m}$ 、150  $\mu\text{m}$ )。在一些实施方案中,通道的深度在 25  $\mu\text{m}$  至 200  $\mu\text{m}$  的范围内 (例如, 25  $\mu\text{m}$ 、30  $\mu\text{m}$ 、40  $\mu\text{m}$ 、50  $\mu\text{m}$ 、60  $\mu\text{m}$ 、70  $\mu\text{m}$ 、80  $\mu\text{m}$ 、90  $\mu\text{m}$ 、100  $\mu\text{m}$ 、110  $\mu\text{m}$ 、120  $\mu\text{m}$ 、130  $\mu\text{m}$ 、140  $\mu\text{m}$ 、150  $\mu\text{m}$ 、160  $\mu\text{m}$ 、170  $\mu\text{m}$ 、180  $\mu\text{m}$ 、190  $\mu\text{m}$ 、200  $\mu\text{m}$ )。在一些实施方案中,通道的宽度在 75  $\mu\text{m}$  至 125  $\mu\text{m}$  的范围内 (例如, 90  $\mu\text{m}$  至 110  $\mu\text{m}$ 、约 100  $\mu\text{m}$ 、100  $\mu\text{m}$ )。在一些实施方案中,每个通道容纳 0.1  $\mu\text{l}$  至 5  $\mu\text{l}$  之间的溶液 (例如, 0.1  $\mu\text{l}$ 、0.2  $\mu\text{l}$ 、0.3  $\mu\text{l}$ 、0.4  $\mu\text{l}$ 、0.5  $\mu\text{l}$ 、0.6  $\mu\text{l}$ 、0.7  $\mu\text{l}$ 、0.8  $\mu\text{l}$ 、0.9  $\mu\text{l}$ 、1.0  $\mu\text{l}$ 、1.1  $\mu\text{l}$ 、1.2  $\mu\text{l}$ 、1.3  $\mu\text{l}$ 、1.4  $\mu\text{l}$ 、1.5  $\mu\text{l}$ 、1.6  $\mu\text{l}$ 、1.7  $\mu\text{l}$ 、1.8  $\mu\text{l}$ 、1.9  $\mu\text{l}$ 、2  $\mu\text{l}$ ... 3  $\mu\text{l}$ ... 4  $\mu\text{l}$ ... 5  $\mu\text{l}$ )。

[0034] 在一些实施方案中,微流体装置与以下中的一种或多种一起被提供为试剂盒的部分:适当设定大小的膜、具有被配置来配合装置的通道的泳道的适当设定大小的凝胶、抗体溶液、缓冲液、激活溶液、具有被配置来配合装置的通道的泳道的用于浇注凝胶的梳子、说

说明书等。在一些实施方案中,针对特定分析来优化装置或套件。在一些实施方案中,试剂盒设置有抗体和用于进行特定分析的泳道配置。

[0035] 在一些实施方案中,通道组和 / 或微流体通道在整个装置上是不一致的。根据组宽、每组微通道数、微通道宽度、间距等中的一项或多项,单一装置上的通道可在整个单一装置上不同。

[0036] B. 方法

[0037] 在一些实施方案中,利用本发明的装置,使用任何合适的技术和试剂进行免疫印迹实验。

[0038] 用本发明的装置进行免疫印迹的示例性程序如下。将含蛋白质的样品上样至凝胶(例如,聚丙烯酰胺凝胶)的孔中并且通过凝胶电泳(例如,天然凝胶电泳、SDS-PAGE等)分离样品中存在的蛋白质。将膜(例如,PVDF膜)放置在凝胶顶上以允许蛋白质转移至膜上。然后将膜放置在玻璃载玻片上。将微流体装置放置在膜顶上并且使微流体通道与蛋白质泳道对齐。将封闭缓冲液(例如,Tween-20和BSA)任选地注入每个通道。在有封闭步骤的实施方案中,通道的入口 / 出口被覆盖(例如,用胶带)以使孵育期间的蒸发减到最少。将抗体注入适当的通道(例如,一组内每个微通道中的不同抗体)。入口 / 出口被覆盖(例如,用胶带)以使孵育期间的蒸发减到最少。孵育(例如,1小时)之后,将微流体装置去除并且将膜转移至适当二抗的溶液中(例如,将膜留在此溶液中1小时或直到膜完全湿润)。将膜从二抗溶液中去除并且用新鲜的封闭缓冲液洗涤(例如,5次,每次3分钟)。将膜转移至显色溶液中(例如,30分钟)并且将膜去除并用DI水冲洗。然后使膜干燥。在一些实施方案中,可针对替代程序或为适应特定用途而改变上述的任何或所有步骤。例如,在一些实施方案中,将装置放置在有预先上样至通道内的抗体的膜上。在其他实施方案中,将封闭、二抗溶液、洗涤和显色溶液施加穿过微流体通道。在一些实施方案中,将样品直接或从除凝胶外的其他表面(例如,微量滴定板、阵列等)放置在膜上。

[0039] 在一些实施方案中,使相同的样品在相同的条件下在凝胶的多个孔上运行。在此类情况下,多个通道组的微流体通道可全部被上样不同的抗体以分析相同的样品。在其他实施方案中,使不同的样品(或在不同的条件下的相同的样品)在两个或更多个凝胶泳道上运行。在此类情况下,各个通道组可被同等上样以利用相同抗体组探测每个样品。

[0040] 在一些实施方案中,装置和 / 或膜包括疏水表面(例如,PDMS和PVDF)。在本发明实施方案的开发期间进行的实验揭示在装置与膜之间达到合适的密封是有挑战的。在一些实施方案中,为克服这个挑战,执行激活步骤(例如,装置的和 / 或膜的)以增强装置与膜之间的密封。在一些实施方案中,通过微流体通道激活密封。在一些实施方案中,将激活溶液施用于装置的膜接触表面。在一些实施方案中,将激活溶液施用于膜。在一些实施方案中,激活利用PDMS/PVDF表面与所用的水性溶液之间的疏水 / 亲水差异。

[0041] 在一些实施方案中,通过任何合适的结构或方法将溶液加入到微流体通道。在一些实施方案中,溶液被注入通道。在一些实施方案中,溶液被注入通道一端的储蓄池。在一些实施方案中,溶液添加不需要泵和 / 或阀。在一些实施方案中,使用针(例如,10-40量规(例如12量规……16量规……20量规……24量规……27.5量规……30量规……36量规……40量规))将溶液(例如,抗体溶液)引入通道中。在一些实施方案中,将溶液从适当尺寸的针(例如,27.5量规)引入适当尺寸的储蓄池在针的周围产生“压塞”效应,这大

大增强密封并且有助于微流体通道的填充。

#### [0042] C. 制造

[0043] 在一些实施方案中,使用本领域已知的微流体制造技术制造本发明的装置。各种示例性制造方法在以下文献中描述:Fiorini 和 Chiu,2005,“Disposable microfluidic devices: fabrication, function, and application” *Biotechniques* 38:429-46 ;Beebe 等 2000,“Microfluidic tectonics:a comprehensive construction platform for microfluidic systems.” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:13488-13493 ;Rossier 等, 2002,“Plasma etched polymer microelectrochemical systems” *Lab Chip* 2:145-150 ;Becker 等,2002,“Polymer microfluidic devices” *Talanta* 56:267-287 ;Becker 等,2000,“Polymer microfabrication methods for microfluidic analytical applications” *Electrophoresis* 21:12-26 ;美国专利号 6,767,706B2,例如第 6.8 节“Microfabrication of a Silicon Device”;Terry 等,1979, A Gas Chromatography Air Analyzer Fabricated on a Silicon Wafer, *IEEE Trans. on Electron Devices*, v. ED-26, 第 1880-1886 页 ;Berg 等,1994, *Micro Total Analysis Systems*, New York, Kluwer ; Webster 等,1996, *Monolithic Capillary Gel Electrophoresis Stage with On-Chip Detector in International Conference On Micro Electromechanical Systems, MEMS 96*, 第 491496 页 ;以及 Mastrangelo 等,1989, *Vacuum-Sealed Silicon Micromachined Incandescent Light Source*, *Intl. Electron Devices Meeting, IDEM 89*, 第 503-506 页。出于所有目的,这些参考文献的每项以其整体引用的方式并入本文。在一些实施方案中,在微流体装置的制造中使用的方法可依据所用的材料而变化并且包括软平版印刷法、微装配、体微加工法、表面微加工法、标准平版印刷法、湿蚀刻、反应离子蚀刻、等离子体蚀刻、立体平版印刷和激光化学三维书写法、模块化装配法、复制模塑法、注射成型法、热成型法、激光烧蚀法、方法的组合以及本领域已知的或在将来开发的其他方法。

[0044] 装置制造的示例性方法如下。生成提供装置的设计规格(例如,装置尺寸、通道尺寸、通道间距、每组通道数、通道组数、通道形状、储蓄池的存在、储蓄池的形状/大小等)的计算机辅助设计(CAD)文件。根据CAD规格,生产提供装置的有形设计的掩模(例如,玻璃、聚合物等)。根据掩膜,生产模具(例如,硅晶片模具),方式是将未固化聚合物(例如,聚二甲基硅氧烷(PDMS))浇注至模具中,随后加热掩模和聚合物以固化聚合物(例如,聚合、交联等),产生固体微流体装置。在一些实施方案中,可将单个掩膜重复利用以产生多个(例如,10、100、1000、10,000 或更多)模具。在一些实施方案中,可将单个模重复利用以产生多个(例如,10、100、1000、10,000 或更多)装置。

[0045] 在一些实施方案中,使用软平版印刷技术由聚二甲基硅氧烷(PDMS)制造微流体装置;尽管并且合适的聚合物和技术也在本发明的范围内。

#### [0046] D. 抗体/试剂

[0047] 在一些实施方案中,以有效且可再生的方式配制用于本文所描述的装置的溶液以填充微流体通道。为此,溶液应具有适当的粘度、亲水性等。在本发明实施方案的开发期间进行实验以开发具有适当的特性的溶液用于部署在本文所述的装置微流体通道中。在一些实施方案中,溶液包含一种或多种表面活性剂、洗涤剂、乳化剂、增溶剂等,从而以快速且可再生的方式提供可接受的/最佳的微流体通道填充。在一些实施方案中,溶液包含以下

的一种或多种：月桂基硫酸铵、月桂基硫酸钠（SDS，十二烷基硫酸钠）、月桂醇聚醚硫酸钠、肉豆蔻醇聚醚硫酸钠、二辛基磺基琥珀酸钠、全氟辛烷磺酸盐（PFOS）、全氟丁烷磺酸盐、直链烷基苯磺酸盐（LAB）、硬脂酸钠、月桂酰基肌氨酸钠、全氟壬酸盐、全氟辛酸盐、烷基三甲基铵盐（例如，十六烷基三甲基溴化铵）、氯化十六烷基吡啶（CPC）、苯扎氯铵（BAC）、苜蓿氯铵（BZT）、5-溴-5-硝基-1,3-二噁烷、二甲基双十八烷基氯化铵、西曲溴铵、二甲基双十六烷基溴化铵（DODAB）、CHAPS、椰油酰胺丙基羟基磺基甜菜碱、卵磷脂、聚氧乙烯二醇烷基醚、聚氧丙烯二醇烷基醚、葡糖苷烷基醚、聚氧乙烯二醇辛基酚醚（例如，Triton X-100）、聚氧乙烯二醇烷基苯酚醚、甘油烷基酯、聚氧乙烯二醇脱水山梨醇烷基酯（例如，聚山梨醇酯（例如，聚山梨醇酯 20、聚山梨醇酯 40、聚山梨醇酯 60、聚山梨醇酯 80 等）、脱水山梨醇烷基酯、椰油酰胺 MEA、椰油酰胺 DEA、十二烷基二甲胺氧化物、聚乙二醇和聚丙二醇的嵌段共聚物、聚乙氧基牛脂胺（POEA）等。

[0048] 在一些实施方案中，溶液（例如，抗体溶液、激活溶液、封闭溶液、洗涤溶液等）包含指定浓度的 Tween（例如，Tween-20）和牛血清白蛋白（BSA）。在一些实施方案中，利用有用浓度的 Tween（例如，Tween-20）和 BSA 来提供针对微流体通道长度的有效的溶液流动。在一些实施方案中，利用有用浓度的 Tween（例如，Tween-20）和 BSA 来提供穿过微流体通道的膜的激活 / 润湿。在一些实施方案中，溶液包含 0.01% 至 5% 之间的 BSA（例如，0.01% ... 0.02% ... 0.05% ... 0.1% ... 0.2% ... 0.5% ... 1% ... 2% ... 5%）。在一些实施方案中，溶液包含 0.01% 至 5% 之间的 Tween（例如，Tween-20）（例如，0.01% ... 0.02% ... 0.05% ... 0.1% ... 0.2% ... 0.5% ... 1% ... 2% ... 5%）。在一些实施方案中，溶液包含约 0.1% 的 BSA 和约 0.1% 的 Tween20。在一些实施方案中，溶液包含 0.1% 的 BSA 和 0.1% 的 Tween20。

[0049] 在一些实施方案中，溶液（例如，封闭、激活、洗涤、抗体溶液等）包含适当的盐、缓冲剂、金属等，如本领域技术人员将理解的。

[0050] 在一些实施方案中，通过使用可检测的 / 可观察的部分和 / 或标记来显现和 / 或检测结合靶蛋白的抗体。合适的标记和 / 或部分通过光谱、光化学、生物化学、免疫化学、电学、光学或化学手段进行检测。在一些实施方案中，一抗或二抗被连接到检测部分。在一些实施方案中，以酶促方法，例如使用碱性磷酸酶或辣根过氧化物酶进行检测。一些实施方案利用荧光检测。预期可用于本公开的荧光团包括 Alexa 染料（例如，Alexa 350、Alexa 430 等），AMCA、BODIPY 630/650、BODIPY650/665、BODIPY-FL、BODIPY-R6G、BODIPY-TMR、BODIPY-TRX、瀑布蓝（Cascade Blue）、Cy2、Cy3、Cy5、6-FAM、荧光素、HEX、6-JOE、俄勒冈绿 488、俄勒冈绿 500、俄勒冈绿 514、太平洋蓝（Pacific Blue）、REG、罗丹明绿、罗丹明红、ROX、TAMRA、TET、四甲基若丹明、德克萨斯红（Texas Red）等。本领域的技术人员应认识到本文未提到的这些和其他的检测部分都可成功地用于各种实施方案中。

[0051] 能够特异性并稳定地结合靶标、分析物或抗原的任何抗体、抗体片段或其他分子都可用作如本文所述的一抗和二抗（例如，树枝状聚合物、核酸、亲和标签等）。尽管本文所述的实施方案已通常利用抗体（例如，一抗、二抗）来分析样品的蛋白质含量，但本发明不限于抗体的使用。应将实施方案广泛地理解为还包括其他结合分子。

[0052] E. 应用

[0053] 本发明的实施方案可用于其中已使用传统蛋白质印迹的任何应用。而且，由于消

除了蛋白质印迹的成本、时间、试剂、生产量和多重能力的局限性,本文所述的装置和方法可用于传统蛋白质印迹不足的另外研究、临床、诊断和流行病学应用。例如,信号传导通路的快速、平行分析已经在生物科学和临床医学中经过了漫长的探索。为了充分理解这些信号传导通路的动力学,必须对其蛋白组分进行分析。这些组分通常用蛋白质免疫印迹来分析。尽管传统蛋白质免疫印迹是强大的技术,但这种技术具有若干局限性,包括大的样品需求、高的抗体量和分析生产量的限制。本发明的微流体免疫印迹装置提供信号传导通路的蛋白质组分的快速、平行的分析。本装置和方法的效用已通过细胞模型和临床样品中对常见炎症信号传导通路(例如,NF $\kappa$ B、JAK-STAT和MAPK)的分析来证明。在本发明实施方案的开发期间进行的实验证明微流体免疫印迹装置可以与传统蛋白质免疫印迹相似的精确度分析内源性蛋白质,但是有2800倍减少的抗体和多重的能力。此外,本微流体装置对接普遍可用的免疫印迹设备并且与现存的蛋白质检测方法是兼容的。

#### [0054] 实验

[0055] 在过去十年中,炎症已被确认为慢性疾病(包括癌症和心脏疾病)的驱动者(Saleh和Trinchieri 2011;Hansson 2005;以其整体引用的方式并入本文)。尽管涉及许多调节性步骤,但蛋白质修饰是炎症反应的限定特征(Anderson 2010;Anderson 2008;Akira和Takeda 2004;以其整体引用的方式并入本文)。由于对炎症反应中蛋白质激活的重要性的认识的增长,越来越需要强大的技术来监控这些动态反应。

#### [0056] 实施例1

##### [0057] 材料和方法

##### [0058] 微流体蛋白质免疫印迹

[0059] 凝胶电泳后,将凝胶以30V印迹到PVDF膜(Invitrogen)上保持1小时。在进行微流体免疫印迹之前,将电印迹PVDF膜干燥过夜。通过将电印迹PVDF膜夹在玻璃支架和PDMS微流体装置之间形成微流体组装体。使PDMS微流体装置与梯状物对齐以确保在样品泳道上准确的通道布置。为完成组装,将两个玻璃载玻片放置在PDMS装置的顶部用于进一步的支撑。两个玻璃载玻片的间距大约是0.5mm并且被用作注射位点。用带27G 1/2针头的1ml注射器注射激活溶液和抗体溶液。用0.1%的BSA和0.1%的Tween20 TBS溶液穿过微流体通道将PVDF膜激活。将一抗穿过微流体通道注射并且孵育1小时。在0.1%的BSA和0.1%的Tween20 TBS溶液中制备一抗和二抗稀释液。

[0060] 在一抗孵育期之后,去除微流体装置并且洗涤膜,将膜在0.1%的BSA和0.1%的Tween20 TBS中封闭1小时,并且然后在用碱性磷酸酶或辣根过氧化物酶进行化学发光检测之前,用二抗染色1小时。

##### [0061] 凝胶电泳和蛋白质免疫印迹

[0062] 对于外周血单核细胞(PBMC),向同意参加本机构审查委员会研究的健康个体提供书面知情同意书。用装有柠檬酸钠的BD Vacutainer CPT细胞制备管分离PBMC。分离之后,用如下描述的RIPA缓冲液收集PBMC细胞裂解液。鼠巨噬细胞系(RAW264.7)购自美国典型培养物保藏中心(ATCC;Manassas, VA)并且在补充有青霉素(100U/ml)、链霉素(100 $\mu$ g/ml)和10%胎牛血清(Invitrogen)的RPMI培养基(Invitrogen;Carlsbad, CA)中以 $3.0 \times 10^6$ 的密度培养。使细胞粘附4至6小时后,将培养基更换为补充有0.5%的FBS、青霉素(100U/ml)、链霉素(100 $\mu$ g/ml)的RPMI培养基并且孵育过夜(14-18h)。通

过在包含来自大肠杆菌 055:B5 (Sigma-Aldridge ;St Louis, MO) 的 100ng/ml 浓度的脂多糖 (LPS) 的 0.5% 的 FBS 培养基中孵育, 开始内毒素刺激。然后收获细胞并用包含 25mM pH 为 7.6 的 Tris-HCl、150mM 的 NaCl、1% 的 Nonidet P-40、1% 的脱氧胆酸钠、1mM 的 Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 和 10mM 的 NaF (磷酸酶抑制剂) 和 0.1% 的每 1ml 的缓冲液中加入 10 μl Halt 蛋白酶抑制剂混合物 (Pierce, Rockford, IL) 的 SDS 的 RIPA 缓冲液裂解细胞。使用 SDS-PAGE 电泳分离样品并且转移至 PVDF 膜。然后用针对活性 -JNK (磷酸 -JNK1/2 ;Promega ;Madison, WI)、活性 -MAPK (磷酸 -ERK ;Promega) 和 ERK-1 (Santa Cruz Biotechnology ;Santa Cruz, CA)、NF-κ B p65 (Cell Signaling Technology ;Beverly, MA)、STAT3(sc-483 ;Santa Cruz Biotechnology) 和磷酸 -STAT3 (Cell Signaling Technology) 的兔抗体探测 PVDF 膜。以 1:20000 的稀释度使用辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶山羊抗兔二抗 (Thermo Scientific)。

[0063] 实施例 2

[0064] 结果

[0065] 微流体装置的设计和对接

[0066] 设计聚(二甲基硅氧烷) (PDMS) 微流体装置以与现存的免疫印迹设备对接。大约 8cm 长且 6cm 宽的装置由 5 个以与传统蛋白质印迹中的蛋白质泳道之间的间距对应的间距隔开的泳道组成。每个泳道中存在 3 个微流体通道 (6cm 长、150 μm 宽、100 μm 深)。

[0067] 使用标准软平版印刷技术制造所述装置 (Wu 等 2003)。简而言之, 使用包含微流体装置设计的 CAD 文件印刷透明掩膜 (CAD/Art Services ;Inc., Bandon, OR)。使用软平版印刷术由透明掩膜制造硅母模。通过将预聚物和固化剂以 12:1 的质量比混合 (Sylgard 184 硅酮弹性体试剂盒, Dow Corning) 并且然后将混合物浇注至硅母模上来形成微流体装置。在固化之前, 将未固化的装置在 60°C 脱气 1 小时以除去在混合时形成的任何气泡。

[0068] 所述方法由 3 个阶段组成, 包括凝胶电泳、转移至 PVDF 膜以及使用微流体装置对靶蛋白进行免疫印迹 (图 1)。前两个阶段类似于传统免疫印迹, 这允许我们的微流体装置与现存的设备轻松对接。

[0069] 在分离且转移样品之后, 将 PVDF 膜干燥。然后将 PVDF 膜夹入玻璃支架和 PDMS 微流体装置之间。通过将封闭溶液注射穿过微流体并且允许所述封闭溶液静置 20 分钟来激活 PVDF 膜。在激活 PVDF 膜之后, 将一抗注射穿过微流体通道并且孵育 1 小时。在与一抗孵育之后, 去除微流体装置并且在进行到检测阶段之前, 洗涤且封闭 PVDF 膜。为检测一抗, 将整个 PVDF 膜与适当的二抗孵育并且用碱性磷酸酶或辣根过氧化物酶化学发光方法进行检测。

[0070] 传统免疫印迹和微流体免疫印迹的比较

[0071] 为直接评估我们的微流体免疫印迹装置与传统免疫印迹相比的精确度, 从健康志愿者收集外周血单核细胞 (PBMC) 并且如前所述的那样分离细胞裂解液。用凝胶电泳分离 5 和 0.5 微克蛋白质, 接着转移至 PVDF 膜。使用针对 RelA (p65) (NF-κ B 转录家族的一个成员) 的一抗, 在两种不同的一抗稀释液和蛋白质上样量下比较微流体免疫印迹和传统免疫印迹之间的信号 (图 2)。对于两种上样量和抗体稀释液, 两种方法展示对于 p65 的类似信号。重要的是, 使用与传统免疫印迹所使用的相同的抗体稀释液, 微流体装置获得类似的信号强度。对于这些实验中使用的 PVDF 膜的大小, 传统免疫印迹分析 1 种蛋白质需要大约 10mL 的一抗溶液。基于微流体通道的尺寸 (0.015cm、0.010cm 和 6.000cm), 每个通道需要大

约 0.0009mL 的一抗溶液。使用所述微流体装置,分析 PVDF 膜的 1 种蛋白需要 0.0036mL (4 个泳道 \*0.0009mL 抗体 / 泳道 = 0.0036mL 抗体 / 蛋白质) 的一抗溶液。即使保守的假设并且忽略它的多重能力,与传统蛋白质免疫印迹相比,微流体免疫印迹转化为大约 2800 倍的抗体量的减少。

[0072] 监测炎性通路激活和蛋白质修饰

[0073] 炎性通路通常由信号传导蛋白的翻译后修饰来调节 (Medzhitov2008,2010 ;以其整体引用的方式并入本文)。监测这些蛋白质修饰对于理解炎性反应的动力学是至关重要的。与 NF- $\kappa$ B 转录家族类似,转录的信号转导物和激活物 (STAT) 家族是炎性反应的关键介体 (Ho 等 2009 ;以其整体引用的方式并入本文)。响应于细胞因子和生长因子,STAT 家族成员被受体相关的激酶磷酸化 (Hu 等 2007 ;O' Sullivan 等 2007 ;以其整体引用的方式并入本文)。蛋白质磷酸化通常用蛋白质免疫印迹监测,但也需要总蛋白质水平的平行监测。在 STAT3 激活的情况下,必须使用蛋白质免疫印迹监控同一样品的磷酸化和总 STAT3 水平。这些类型的实验很好地适合于微流体免疫印迹,因为所述微流体装置允许来自同一样品泳道的磷酸化和总蛋白质的同时分析。为评估我们微流体装置的这种能力,用脂多糖 (LPS) (100ng/ml) 刺激 RAW264.7 细胞 (一种巨噬细胞的细胞系) 24 小时。在 24 小时后,收集细胞裂解液并且用微流体装置和传统免疫印迹探测磷酸 -STAT3 和 STAT3。类似于传统免疫印迹,微流体免疫印迹在 LPS 刺激的巨噬细胞中检测的磷酸 -STAT3 与 STAT 信号传导的炎性激活一致 (图 3)。

[0074] 这些结果表明微流体装置可用于监测与炎性反应相关的翻译后修饰。从同一样品中监测多种蛋白质而不需要膜剥离的能力大大改善了分析产量并且强化了从这些类型的免疫印迹实验得出的结论。

[0075] 监测多组分的炎性通路

[0076] 丝裂原激活蛋白激酶 (MAPK) 通路是另一种协调炎性反应的通路。(Chang 和 Karin 2001 ;以其整体引用的方式并入本文)。更具体地,MAPK 是转导细胞外信号和调节包括细胞增殖、分化和凋亡的多样细胞反应的丝氨酸 / 苏氨酸特异性蛋白激酶。监测这种通路的困难之一是这种通路具有激活模式不同的多种蛋白质成分。由于这些复杂性,用传统免疫印迹监测 MAPK 通路是时间和资源密集型的。

[0077] 本微流体免疫印迹方法的一个独特方面是在 PDMS 微流体装置和 PVDF 膜之间的对接。为实现有效的对接,组合物和激活溶液的持续时间是关键参数。为维持 PDMS 装置和 PVDF 膜之间的有效密封,消除了传统免疫印迹使用的初始封闭步骤。然而,由于一些抗体的交叉反应性和封闭步骤的消除,与传统免疫印迹相比,微流体免疫印迹有可能存在更多非特异性信号,这将因 MAPK 信号传导通路的复杂性而进一步复杂化。为评估我们的微流体装置监测多组分 MAPK 通路的能力,将 RAW264.7 细胞与 LPS (100ng/ml) 孵育 45 分钟并且如上所述的那样收集细胞裂解液。用传统蛋白质免疫印迹和微流体蛋白质免疫印迹探测样品的磷酸 -JNK、磷酸 -ERK 和总 ERK (图 4)。对比需要三种不同的 PVDF 膜的传统免疫印迹,微流体方法允许仅用两个样品泳道从 PVDF 膜的一半同时监测这些蛋白质组分。通过从同一样品同时探测总 ERK,与传统免疫印迹相比,使时间、资源和可变性减到最少。重要的是,即使在微流体免疫印迹方法中消除了封闭步骤,这两种方法却有同等的背景。

[0078] 用其他常用的化学发光检测方法评估微流体免疫印迹技术的灵活性。辣根过氧化

物酶和碱性磷酸酶都具有极好的灵敏度。然而,这种较高的灵敏度也使得它们更容易受到背景噪音的影响。使用如上相同的细胞裂解液和 MAPK 抗体运行微流体免疫印迹。然后使用辣根过氧化物酶二抗检测一抗。使用微流体免疫印迹装置(图 4),HRP 检测与碱性磷酸酶(AP)检测的功效是等同的,这进一步扩大了这种方法的效用。

[0079] 本申请提到的和/或下文列出的所有出版物和专利以引用的方式并入本文。在不背离本发明的范围和精神的情况下,所描述的特点和实施方案的各修改、重组和变化对于本领域的那些技术人员来说是显而易见的。尽管已描述特定的实施方案,但应明白所要求的本发明不应该过度限制于所述特定的实施方案。事实上,对相关领域技术人员来说显而易见的对所描述模式和实施方案的各修改意图在以下权利要求的范围内。

[0080] 参考文献

[0081] Akira S, Takeda K(2004)Toll-like receptor signalling.Nat Rev Immunol 4(7):499-511.

[0082] Anderson P(2008)Post-transcriptional control of cytokine production. Nat Immunol9(4):353-359.

[0083] Anderson P(2010)Post-transcriptional regulons coordinate the initiation and resolution of inflammation.Nat Rev Immunol 10(1):24-35.

[0084] Chang L, Karin M(2001)Mammalian MAP kinase signalling cascades. Nature 410(6824):37-40.

[0085] Chen X, Kapil MA, Hughes AJ, Herr AE(2011)Single-microchannel, multistep assay reports protein size and immunoaffinity. Anal Chem 83(17):6573-6579.

[0086] Ciaccio MF, Wagner JP, Chuu CP, Lauffenburger DA, Jones RB(2010)Systems analysis of EGF receptor signaling dynamics with microwestern arrays. Nat Methods 7(2):148-155.

[0087] Geng T, Bao N, Litt MD, Glaros TG, Li L, Lu C(2011)Histone modification analysis by chromatin immunoprecipitation from a low number of cells on a microfluidic platform. Lab Chip 11(17):2842-2848.

[0088] Hansson GK(2005)Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. N Engl J Med 352(16):1685-1695. doi:352/16/1685[pii]

[0089] He M, Herr AE(2009)Microfluidic polyacrylamide gel electrophoresis with in situ immunoblotting for native protein analysis. Anal Chem 81(19):8177-8184.

[0090] Ho MK, Su Y, Young WW, Wong YH(2009)Regulation of transcription factors by heterotrimeric G proteins. Curr Mol Pharmacol 2(1):19-31

[0091] Hu X, Chen J, Wang L, Ivashkiv LB(2007) Crosstalk among Jak-STAT, Toll-like receptor, and ITAM dependent pathways in macrophage activation. J Leukoc Biol 82(2):237-243.

[0092] Hughes AJ, Herr AE(2012)Microfluidic Western blotting. Proc Natl Acad Sci U S A 109(52):21450-21455.

[0093] Medzhitov R(2008)Origin and physiological roles of inflammation. Nature 454(7203):428-435.

- [0094] Medzhitov R(2010)Inflammation 2010:new adventures of an old flame. Cell 140(6):771-776. doi:S0092-
- [0095] O' Sullivan LA, Liongue C, Lewis RS, Stephenson SE, Ward AC(2007) Cytokine receptor signaling through the Jak-Stat-Socs pathway in disease. Mol Immunol 44(10):2497-2506.
- [0096] Pan W, Chen W, Jiang X(2010)Microfluidic Western blot. Anal Chem 82(10):3974-3976.
- [0097] Pimkova K, Bockova M, Hegnerova K, Suttnar J, Cermak J, Homola J, Dyr JE(2011)Surface plasmon resonance biosensor for the detection of VEGFR-1-a protein marker of myelodysplastic syndromes. Anal Bioanal Chem.
- [0098] Salch M, Trinchieri G(2011)Innate immune mechanisms of colitis and colitis-associated colorectal cancer. Nat Rev Immunol 11(1):9-20.
- [0099] Tia SQ, He M, Kim D, Herr AE(2011)Multianalyte On-Chip Native Western Blotting. Anal Chem.
- [0100] Towbin H, Staehelin T, Gordon J(1979)Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets:procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci U S A 76(9):4350-4354
- [0101] Wu H, Odom TW, Chiu DT, Whitesides GM(2003)Fabrication of complex three-dimensional microchannel systems in PDMS. J Am Chem Soc 125(2):554-559.
- [0102] Wu Y, Li Q, Chen XZ(2007)Detecting protein-protein interactions by Far western blotting. Nat Protoc 2(12):3278-3284.
- [0103] Zubair A, Burbelo PD, Vincent LG, Iadarola MJ, Smith PD, Morgan NY(2011) Microfluidic LIPS for serum antibody detection:demonstration of a rapid test for HSV-2 infection. Biomed Microdevices 13(6):1053-1062.

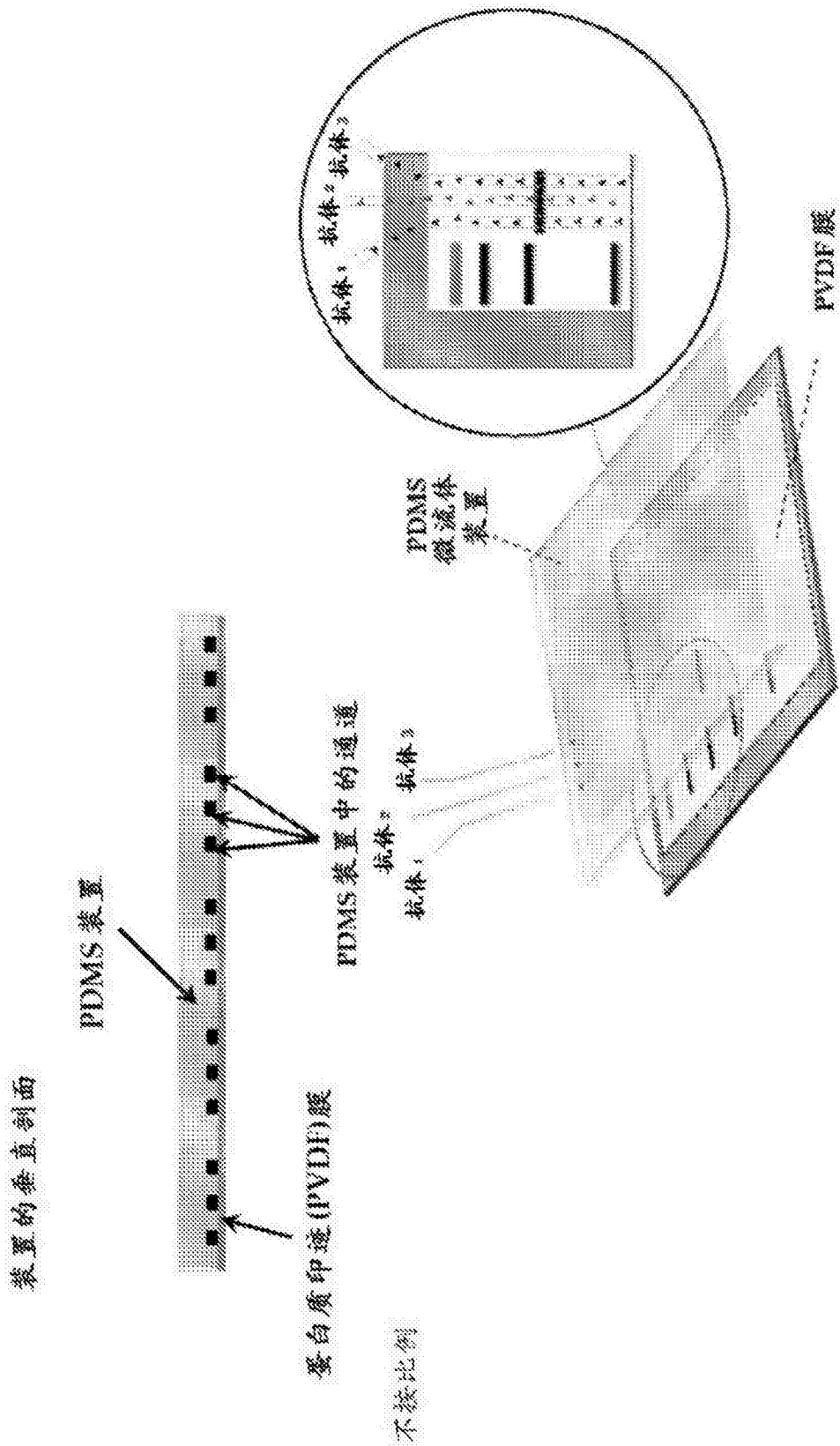


图 1

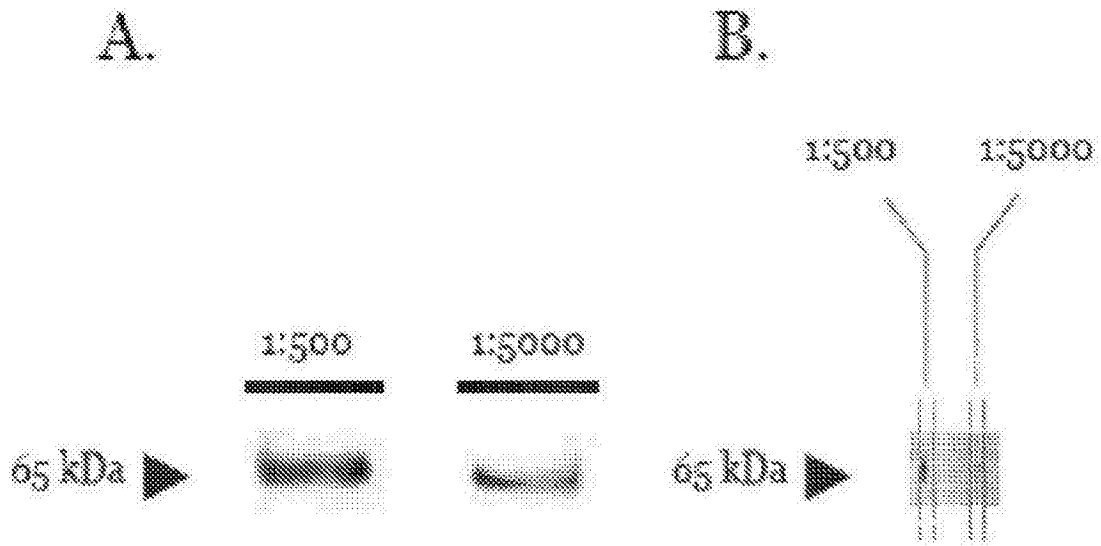


图 2

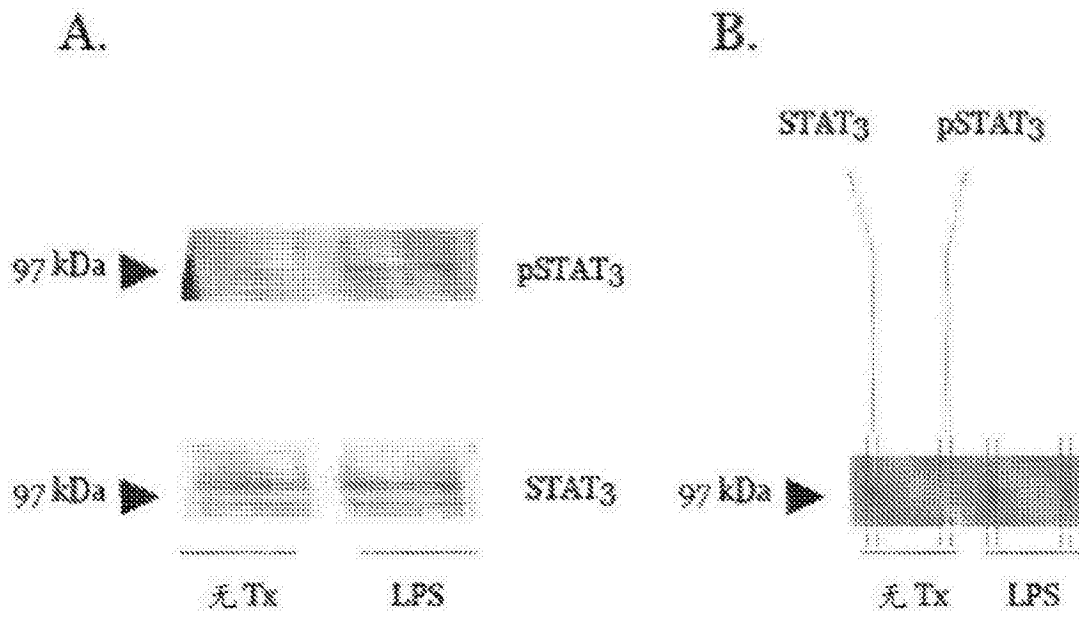


图 3

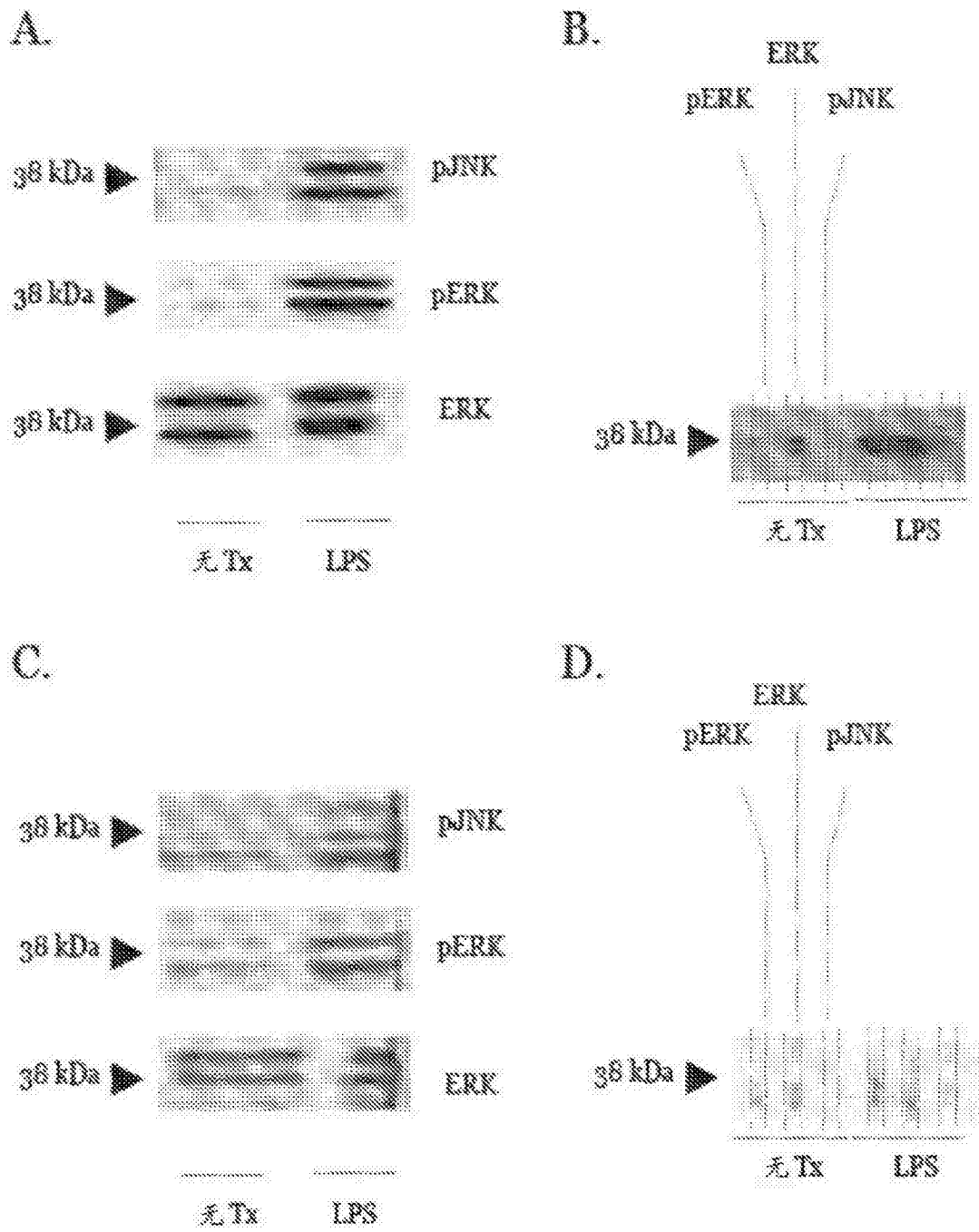


图 4

专利名称(译)	用于免疫印迹的微流体装置		
公开(公告)号	<a href="#">CN105209917A</a>	公开(公告)日	2015-12-30
申请号	CN201480025572.3	申请日	2014-03-12
[标]申请(专利权)人(译)	密歇根大学		
申请(专利权)人(译)	密歇根大学董事会		
当前申请(专利权)人(译)	密歇根大学董事会		
[标]发明人	SN古纳瓦德纳 C加斯珀 小詹姆斯R贝克 PR勒鲁埃伊 HN昌		
发明人	S·N·古纳瓦德纳 C·加斯珀 小詹姆斯·R·贝克 P·R·勒鲁埃伊 H·N·昌		
IPC分类号	G01N33/561 G01N33/49 G01N33/53		
CPC分类号	G01N27/44739 G01N33/54366 G01N33/6803 G01N33/561		
代理人(译)	刘磊		
优先权	61/777682 2013-03-12 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明提供用于在免疫印迹应用中使用的微流体装置、系统和方法。具体而言，本文提供的装置和方法具有传统蛋白质印迹的优点，同时具有增加的生产量和多重能力以及减少的时间、样品和试剂需求。

