



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107209183 B

(45)授权公告日 2019.09.24

(21)申请号 201680006863.7

(22)申请日 2016.01.21

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 107209183 A

(43)申请公布日 2017.09.26

(30)优先权数据
62/107,131 2015.01.23 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2017.07.21

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2016/014337 2016.01.21

(87)PCT国际申请的公布数据
W02016/118757 EN 2016.07.28

(73)专利权人 生物辐射实验室股份有限公司
地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 L·宁

(74)专利代理机构 上海专利商标事务所有限公
司 31100

代理人 陈扬扬 陶启长

(51)Int.Cl.
G01N 33/561(2006.01)
G01N 33/53(2006.01)
G01N 33/49(2006.01)

(56)对比文件
US 2014311909 A1,2014.10.23,说明书第
30-61段.
US 2014311909 A1,2014.10.23,说明书第
30-61段.
WO 2014165185 A1,2014.10.09,说明书第1
页倒数第10行至说明书第3页第15行、说明书第
10页第3-32行,实施例1.
US 2007134747 A1,2007.06.14,全文.

审查员 周洋

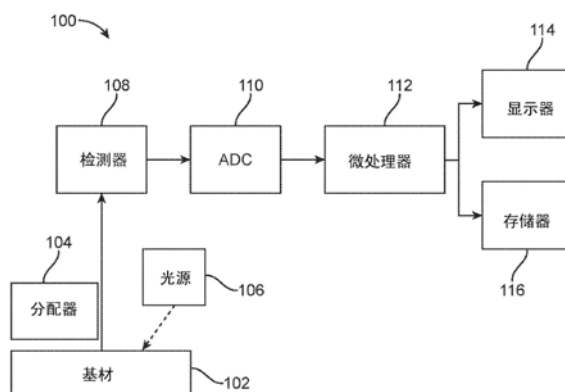
权利要求书3页 说明书16页 附图9页

(54)发明名称

免疫印迹系统和方法

(57)摘要

提供了免疫印迹系统和方法。在一个实施方案中,可通过以下来实现该方法:将抗体溶液施加到具有转移到其上的光学可检测蛋白质和靶蛋白质的膜的表面,其中抗体溶液的施用由从光学可检测蛋白质发射的信号引导;并检测靶蛋白质。也描述并显示了系统和其他方法。



1. 一种免疫印迹的方法,包括:

将抗体溶液施加到具有转移到其上的光学可检测蛋白质和靶蛋白质的膜的表面,其中所述抗体溶液的施加由从所述光学可检测蛋白质发射的信号引导;并且

检测所述靶蛋白质。

2. 如权利要求1所述的方法,还包括洗涤步骤,其中未结合的材料从膜上除去。

3. 如权利要求2所述的方法,其中所述抗体溶液的施加步骤与所述洗涤步骤同时进行。

4. 如权利要求1所述的方法,其中,所述抗体溶液的施加步骤包括分配所述抗体溶液的微流体体积。

5. 如权利要求1所述的方法,其中,所述抗体溶液的施加步骤包括分配所述抗体溶液的亚微流体体积。

6. 如权利要求1所述的方法,其中,所述抗体溶液的施加步骤包括用选自下组的技术分配所述抗体溶液:流体动力学流动约束、喷墨印刷、喷雾沉积、微点滴定和微接触印刷。

7. 如权利要求1所述的方法,其中,所述抗体溶液的施加步骤包括用微流体探针分配所述抗体溶液。

8. 如权利要求7所述的方法,其中,所述微流体探针包括多个微通道。

9. 如权利要求7所述的方法,其中所述微流体探针是微流体探针的阵列。

10. 如权利要求1所述的方法,其中所述抗体溶液的施加步骤包括将抗体溶液分配到所述膜的表面上的至少一个离散路径中。

11. 如权利要求10所述的方法,其中所述路径跨越一个或多个蛋白质条带的泳道长度。

12. 如权利要求10所述的方法,其中所述路径为25纳米至500微米宽。

13. 如权利要求1所述的方法,其中所述抗体溶液的施加步骤包括将2种抗体溶液各自分配到所述膜的表面上的泳道上的离散路径中。

14. 如权利要求1所述的方法,其中所述抗体溶液的施加步骤包括将抗体溶液分配到至少一个离散斑点中。

15. 如权利要求1所述的方法,其中所述抗体溶液的施加步骤包括分配一抗溶液和二抗溶液。

16. 如权利要求1所述的方法,其中所述膜包含选自下组的材料:聚偏二氟乙烯、硝酸纤维素、尼龙和聚砜。

17. 如权利要求1所述的方法,其中转移到膜上的光学标记的蛋白质用选自下组的物质标记:荧光染料,比色染料和卤代烷烃。

18. 如权利要求1所述的方法,还包括在施加抗体溶液之前将封闭溶液施加到膜的表面。

19. 一种免疫印迹系统,其包括:

具有转移到其上的光学可检测的蛋白质的膜;

配置为分配抗体溶液的分配器;

配置为照射所述膜的光源;

配置为检测所述光学可检测的蛋白质的检测器;

处理器;和

存储器,其包括用于存储指令的数据存储单元,所述指令可由所述处理器执行,并且配

置所述系统以根据由所述检测器检测到的光学可检测蛋白质来分配所述抗体溶液。

20. 如权利要求19所述的免疫印迹系统,其中所述检测器还配置成检测靶蛋白质。

21. 如权利要求19所述的免疫印迹系统,还包括配置成检测靶蛋白质的第二检测器。

22. 如权利要求19所述的免疫印迹系统,其中所述分配器选自下组:流体动力学流动约束分配器、喷墨打印机、喷雾沉积分配器、微型点阵器和微接触式打印机。

23. 如权利要求19所述的免疫印迹系统,其中所述分配器是微流体探针。

24. 如权利要求23所述的免疫印迹系统,其中,所述微流体探针包括多个微通道。

25. 如权利要求23所述的免疫印迹系统,其中所述微流体探针是微流体探针的阵列。

26. 一种免疫印迹的方法,包括:

将抗体溶液施加到具有转移到其上的含卤代烷基化色氨酸的蛋白质和靶蛋白质的膜的表面,其中所述抗体溶液的施加由所述含卤代烷基化色氨酸的蛋白质的荧光引导;并且检测所述靶蛋白质。

27. 一种免疫印迹系统,其包括:

具有转移的含卤代烷基化色氨酸的蛋白质的膜;

配置为分配抗体溶液的分配器;

配置为照射所述膜的光源;

配置为检测所述含卤代烷基化色氨酸的蛋白质的检测器;

处理器;和

存储器,其包括用于存储指令的数据存储单元,所述指令可由所述处理器执行,并且配置所述系统以根据由所述检测器检测到的含卤代烷基化色氨酸的蛋白质来分配所述抗体溶液。

28. 一种印迹方法,包括:

将核酸探针施加到具有转移到其上的荧光标记的核酸片段和靶核酸片段的膜的表面,其中所述核酸探针的施加由从所述荧光标记的核酸片段发出的信号引导;并且

检测所述靶核酸片段。

29. 如权利要求28所述的方法,还包括洗涤步骤,其中未结合的材料从膜上除去。

30. 如权利要求29所述的方法,其中所述探针的施加步骤与所述洗涤步骤同时进行。

31. 如权利要求28所述的方法,其中,所述核酸探针的施加步骤包括分配所述探针的微流体体积。

32. 如权利要求28所述的方法,其中,所述核酸探针的施加步骤包括分配所述探针的亚微流体体积。

33. 如权利要求28所述的方法,其中,所述核酸探针的施加步骤包括用选自下组的技术分配所述核酸探针:流体动力学流动约束、喷墨印刷、喷雾沉积、微点滴定和微接触印刷。

34. 如权利要求28所述的方法,其中,所述核酸探针的施加步骤包括用微流体探针分配所述核酸探针。

35. 如权利要求34所述的方法,其中,所述微流体探针包括多个微通道。

36. 如权利要求34所述的方法,其中所述微流体探针是微流体探针的阵列。

37. 如权利要求28所述的方法,其中所述核酸探针的施加步骤包括将所述核酸探针分配到所述膜的表面上的至少一个离散路径中。

38. 如权利要求37所述的方法,其中所述路径跨越一个或多个蛋白质条带的泳道的长度。

39. 如权利要求37所述的方法,其中所述路径为25纳米至500微米宽。

40. 如权利要求28所述的方法,其中所述核酸探针的施加步骤包括将2种核酸探针各自分配到所述膜的表面上的泳道上的离散路径中。

41. 如权利要求28所述的方法,其中所述核酸探针的施加步骤包括将所述核酸探针分配到至少一个离散斑点中。

42. 如权利要求28所述的方法,其中所述膜包含选自下组的材料:聚偏二氟乙烯、硝酸纤维素、尼龙和聚砜。

43. 如权利要求28所述的方法,其中转移到所述膜上的荧光标记的核酸片段用溴化乙锭标记。

44. 如权利要求28所述的方法,还包括在施加所述核酸探针之前将封闭溶液施加到所述膜的表面。

45. 一种印迹系统,其包括:

具有转移到其上的荧光标记的核酸片段的膜;

配置为分配核酸探针的分配器;

配置为照射所述膜的光源;

配置为检测所述荧光标记的核酸片段的检测器;

处理器;和

存储器,其包括用于存储指令的数据存储单元,所述指令可由所述处理器执行,并且配置所述系统以根据由所述检测器检测到的所述荧光标记的核酸片段来分配所述核酸探针。

46. 如权利要求45所述的印迹系统,其中所述检测器还配置成检测靶核酸片段。

47. 如权利要求45所述的印迹系统,还包括配置成检测靶核酸片段的第二检测器。

48. 如权利要求45所述的印迹系统,其中所述分配器选自下组:流体动力学流动约束分配器、喷墨打印机、喷雾沉积分配器、微型点阵器和微接触式打印机。

49. 如权利要求45所述的印迹系统,其中所述分配器是微流体探针。

50. 如权利要求49所述的印迹系统,其中,所述微流体探针包括多个微通道。

51. 如权利要求49所述的印迹系统,其中所述微流体探针是微流体探针的阵列。

免疫印迹系统和方法

[0001] 相关申请的交叉参考

[0002] 本申请要求于2015年1月23日提交的美国临时申请号62/107,131的优先权,其通过引用纳入本文用于所有目的。

[0003] 发明背景

[0004] 印迹是用于将大分子从电泳基质转移到膜进行进一步分析的过程。Southern印迹用于DNA分析,Northern印迹用于RNA分析,并且Western印迹用于蛋白质分析。

[0005] 在Western印迹(或免疫印迹)中,通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离样品中的蛋白质,然后通过毛细管作用或电印迹转移到膜(例如,硝酸纤维素或聚偏乙烯)上。蛋白质固定在膜的表面之后,使蛋白质与特异性结合靶蛋白质的一抗接触。然后,例如,通过使一抗与偶联到可检测标记(如荧光标记)的二抗接触来检测结合的一抗。然后通过光学技术(即,测量发射光的技术)使可检测标记物显像。

[0006] 虽然免疫印迹提供了有用的信息,但是该技术是耗时的、需要高水平的技术技能,是试剂密集型,通量有限,并且不太适用于多重化。

发明内容

[0007] 本文公开了免疫印迹系统和使用这种系统的方法。

[0008] 在一个实施方式中,免疫印迹的方法包括将抗体溶液施加到具有转移到其上的光学可检测蛋白质和靶蛋白质的膜的表面,其中抗体溶液的施加由从光学可检测蛋白质发射的信号引导;并检测靶蛋白质。

[0009] 在一些实施方式中,该方法还包括洗涤步骤,其中未结合的材料从膜上除去。在一些实施方式中,抗体溶液施加步骤与洗涤步骤同时进行。在一些实施方式中,将抗体溶液的微流体或亚微流体体积分配到膜的表面上。抗体溶液的施加可以用选自下组的技术进行:流体动力学流动约束(hydrodynamic flow confinement),喷墨印刷,喷雾沉积,微点滴定和微接触印刷。在一些实施方式中,用微流体探针分配抗体溶液。在一个实施方式中,微流体探针具有多个微通道。在另一个实施方式中,微流体探针是探针阵列。

[0010] 在一些实施方式中,将抗体溶液分配在膜表面上的至少一个离散路径(discreet path)中。在一个实施方式中,路径跨越一个或多个蛋白质条带的泳道的长度。在一些实施方式中,路径为25纳米至500微米宽。在某些实施方式中,将抗体溶液分配到至少一个离散斑点(discreet spot)中。在一些实施方式中,施加抗体溶液步骤包括分配一抗溶液和二抗溶液。在一些实施方式中,转移到膜上的光学标记的蛋白质用选自下组的物质标记:荧光染料,比色染料和卤代烷烃。在一个实施方式中,该方法还包括在施加抗体溶液之前将封闭溶液施加到膜的表面。

[0011] 在一些实施方式中,用于免疫印迹的系统包括其上转移有可光学检测的蛋白质的膜;分配器,用于分配抗体溶液;被配置为照亮所述膜的光源;检测器,其被配置为检测所述光学可检测蛋白质;处理器;以及存储器,其包括用于存储指令的数据存储单元,所述指令可由所述处理器执行,并且配置所述系统以根据由所述检测器检测到的光学可检测蛋白质

来分配所述抗体溶液。在一些实施方式中,检测器还配置成检测靶蛋白质。在一些实施方式中,系统还包括被配置为检测靶蛋白质的第二检测器。

[0012] 在其它实施方式中,可以使用配置来探测核酸印迹。

[0013] 附图的简要说明

[0014] 图1显示了根据本发明的实施方式的免疫印迹系统的示意图。

[0015] 图2显示了具有转移至其上的光学可检测蛋白质和靶蛋白质的膜的俯视图,其中根据本发明的实施方式使用微流体探针施加抗体溶液。

[0016] 图3A和3B显示了现有技术的微流体探针。

[0017] 图4显示了具有多个处理液体微通道的微流体探针,其可以连接到单个抗体溶液或根据本发明的实施方式的多个抗体溶液。

[0018] 图5显示根据本发明的一个实施方式平行连接到单个或多个抗体溶液的多个微流体探针。

[0019] 图6是显示根据本发明的实施方式的使用图1的系统将抗体溶液施加到具有光学可检测转移蛋白质的膜的表面的方法的流程图。

[0020] 图7是显示根据本发明的实施方式的将核酸探针溶液施加到具有荧光标记的核酸片段的膜的表面的方法的流程图。

[0021] 图8显示了可用于根据本发明的实施方式的系统和方法的示例性计算机系统的框图。

[0022] 图9A-9C显示了使用微流体探针和模型靶抗原(例如,人血清抗原,hSA)的免疫印迹结果。图9A显示了在施加一抗之前叠加在印迹照片上的微流体探针的路径。对于hSA条带的通过微流体探针进行的一抗(例如,抗hSA)的施加由与含有hSA的泳道相邻的泳道中预染色分子量标记物引导。图9B显示了将抗hSA施加到hSA条带后的印迹图像。图9C是在微流体探针的路径上的信号强度分布。

[0023] 图10A和10B显示了使用微流体探针和模型靶抗原(例如,hSA)的更多的免疫印迹结果。图10A显示了在施加抗-hSA之后叠加在印迹图像上的微流体探针的路径。对于hSA条带的通过微流体探针进行的抗-hSA的施加由与hSA相同的泳道中的预染分子量标记物引导。图10B是在微流体探针的路径上的信号强度分布。

[0024] 定义

[0025] 术语“可光学检测的蛋白质”是指用发光(例如,荧光,比色,磷光或化学发光)物质标记的蛋白质,当用光照射时,其发射光信号。

[0026] 发明详述

[0027] 本文描述了用于免疫印迹的系统和方法。系统和方法有助于免疫印迹的自动化。已经发现免疫印迹的自动化高通量系统和方法可以一次测试多个样品,使用较少量的试剂,并且可以提供快速的测试结果。

[0028] 本文描述的系统和方法的优点包括但不限于:(1)提供自动化或“免手动(hands-free)”的系统;(2)提供使反应化学局部化从而减少反应时间的系统;(3)提供能够进行多重化测试的系统(例如,一次测试多个蛋白质样品或测试多个靶蛋白的单个蛋白质样品);(4)提供能够实时检测靶蛋白质的系统;(5)提供能够沉积较小体积的试剂(例如,抗体溶液)的系统;(6)提供能够使用转移到膜表面上的光学可检测蛋白质引导向膜表面施加抗体

溶液的系统,和/或(7)提供其中抗体溶液的施加和未结合的抗体的去除可同时进行的系统。

[0029] 在本说明书和权利要求书中所用的单数形式“一个”、“一种”和“该”包括多个指示物,除非上下文中有明显的表示。因此,例如,参考包含“抗体溶液”的系统包括包含一种或多种抗体溶液的系统。类似地,参考“光学可检测蛋白质”包括一种或多种光学可检测蛋白质。

[0030] 系统

[0031] 参考图1,显示了用于免疫印迹的系统100。在一个实施方式中,系统100用于将抗体溶液施用于转移有光学可检测蛋白质和靶蛋白质的免疫印迹膜。系统100包括膜102、分配器104、光源106和检测器108。

[0032] 如图2所示,膜102包括从聚丙烯酰胺电泳凝胶转移的一种或多种可光学检测的蛋白质120和靶蛋白质122。在一些实施方式中,膜102安装在可在X-Y和/或Z方向上移动的平台。在一些实施方式中,膜102是湿的。需要湿或潮湿的膜以在检测靶蛋白质122期间降低背景。用于水合膜102的示例性流体包括但不限于缓冲液,封闭溶液,水和/或盐水。示例性膜材料包括聚偏二氟乙烯、尼龙、聚砜和硝酸纤维素。

[0033] 在一些实施方式中,可光学检测的蛋白质120可以用荧光染料、比色染料或卤代烷烃(即,卤素取代的有机化合物)标记的蛋白质。一些实施方式使用如美国专利号8,007,646中所述的卤代烷烃,其全部内容通过引用并入本文。示例性荧光染料包括但不限于,表雄酮,2-甲氧基-2,4-二苯基-3(2H)-咪喃酮,钆基染料(例如,SYPRO[®]红宝石蛋白凝胶染色剂)、花青类染料、基于香豆素的花青染料(例如Bio-Rad Flamingo[™])和Bio-Rad Oriole[™]。示例性比色染料包括考马斯亮蓝和硝酸银。在一些实施方式中,光学可检测蛋白质120在SDS-PAGE之前或期间被标记。在其它实施方式中,可光学检测的蛋白质120在转移到印迹膜102上之后进行标记。在一个实施方式中,在聚丙烯酰胺凝胶中包含卤代烷烃,并且在暴露于UV光时,在SDS-PAGE期间卤代烷烃与蛋白质中的色氨酸残基共价键合。然后将得到的含“无染料”卤代烷基化色氨酸蛋白质转移到膜进行免疫染色。

[0034] 靶蛋白质122可以是任何感兴趣的蛋白质。靶蛋白质122可以包括整个类别的蛋白质,例如酶、激素和/或抗体。

[0035] 再次参考图1,分配器104被配置为分配一个或多个抗体溶液的微流体或亚微流体体积,每个体积分散在膜102的表面上的离散路径124中。在一些实施方式中,路径跨越在膜102的表面上的一个或多个蛋白质条带的泳道的长度。在一个实施方式中,路径的宽度为约25纳米至约500微米宽。在某些实施方式中,路径的宽度为约25微米至约200微米宽。在一些实施方式中,路径是连续的。在一些实施方式中,路径是不连续的。在一些实施方式中,1-50抗体溶液在蛋白质条带上的平行路径中分配。在其他实施方式中,1-20抗体溶液在蛋白质条带上的平行路径中分配。在一些实施方式中,1-10抗体溶液在蛋白质条带上的平行路径中分配。在一些实施方式中,以斑点和/或点的图案分配一种或多种抗体溶液。在一个实施方式中,斑点/点的直径为约25纳米至约500微米。在某些实施方式中,斑点/点的直径为约25纳米至约200微米。在一个实施例中,斑点和/或点阵列覆盖基材的表面。

[0036] 在一些实施例中,分配器104可在X-Y和/或Z方向上移动。分配器104的移动和功能可以是计算机控制的。

[0037] 示例性的分配器包括流体动力学流动约束分配器, 喷墨打印机, 喷雾沉积分配器, 微型点阵器和/或微接触式打印机。在一个实施方式中, 分配器104是在膜102的表面上沉积一种或多种抗体溶液(例如, 一抗和/或二抗溶液)的微流体探针200。在一个实施方式中, 流体动力学流动约束分配器是微流体探针(或垂直MFP), 如美国专利申请13/881, 989中所述, 其全部内容通过引用并入本文。在图3A和3B所示的实施方式中, 微流体探针200可以包括基层220, 其中处理液体微通道223, 224与浸没液体微通道323, 324一起提供。每个通道与孔221, 222, 321, 322流体连通, 每个孔位于基层的表面(不一定是相同的面)上, 并且优选紧邻。通道223, 224, 323, 324还提供电动泵与孔221, 222, 321, 322之间的连接。当在表面附近移动微流体探针200时, 通过孔221提供的处理液体将与浸没液体合并并且优选地插入通过孔321和322提供的浸没液体, 如图3B的弯曲(厚)箭头所象征的。后者是为了理解而提供的; 他们的维度被刻意夸大。在这方面, 在一些实施方式中, 该装置被配置为获得层流。在一些实施方式中, 孔尺寸可以是几十微米(例如, 10-50微米)。在一些实施方式中, 孔尺寸可以为1-50微米。孔通常间隔几百微米(例如, 200-500微米)。由于这里使用成对的处理通道/孔, 所以处理液体可以与一些浸没液体一起在孔222处被再吸出。注意, 孔221和222之间的流动路径可以反转, 即处理液体可以从孔222注入, 而孔221可以吸出液体。处理液体可以基本上位于孔221和222附近, 并被基本上存在于头部200附近的浸没液体包围。覆盖层210封闭开在基层的上表面上的通道开口, 如描述。

[0038] 此外, 在一些实施方式中, 处理液体微通道的一部分以基层220的层厚度中的凹槽223', 224'提供, 在其上表面上有开口。不管横向尺寸(可能很小, 例如几十微米), 这样很容易实现形成微通道。在组装后, 凹槽被覆盖层210的一部分封闭。凹槽可以由工具直接雕刻在基层220的上表面上。其可以具有任意合适的截面形状, 例如, 圆形、正方形、U或V截面。可以根据基层220的材料来选择该工具。在一个变体中, 可以考虑激光烧蚀。最有利的是, 深反应离子蚀刻(DRIE)用于制造微通道。

[0039] 如图3B所示, 凹槽223', 224'延伸到相应的孔221, 222。类似地, 浸没通道223, 224到达相应的孔321, 324。在该示例中, 通道和孔围绕头部的上表面的主轴对称排列。在基层220的前表面320的边缘310的水平处, 在凹槽的端部处直接形成孔, 这在此易于再次加工。所述前端320通常是尖锐的, 这允许感兴趣的表面上的紧密的液体沉积, 并且留下便于光学监测的空间。

[0040] 参考图3A, 通孔211, 212设置在覆盖层210上。附加通孔311被示出, 其允许将流体连通中继到浸没通道323, 324(在这里仅提供一个通孔, 其向两个浸没通道进料)。可以提供连接到通孔的相应管道端口(未显示)。通道具有布置成例如面向通孔的端部。

[0041] 如图3A和3B所示, 微流体探针200包括两个处理液体微通道。在一些实施方式中, 微流体探针200包括两个以上的处理液体微通道。在一些实施方式中, 微流体探针400包括2-50个处理液体微通道(参见图4)。在一些实施方式中, 微流体探针200可以在至少一个处理液体微通道中包括加热元件。加热样品可能会增加抗原和抗体反应的速度, 从而可减少测试时间。

[0042] 在图5所示的实施方式中, 微流体探针是平行连接的探针阵列(即, 探针阵列500), 其可以连接到相同或不同的处理液体。在另一个实施方式中, 探针阵列500中的每个探针包括多个微通道。

[0043] 微流体探针可以由与流过通道的流体相容的材料形成。示例性的相容材料包括但不限于硅、二氧化硅、聚二甲基硅氧烷 (PDMS)、砷化镓、玻璃、陶瓷、石英、聚合物如氯丁橡胶、Teflon™、聚乙烯弹性体、聚丁二烯/SBR、亚硝酸盐、尼龙和/或金属。通道的内表面也可以用合适的材料涂覆以降低流体组分和通道本身之间的亲和性。

[0044] 示例性的处理液体包括抗体溶液、缓冲液、封闭溶液、油 (例如, 矿物油) 和/或空气。示例性浸没液体包括缓冲液、封闭溶液和油。

[0045] 处理和浸没液体被配置成以有效和可重复的方式填充微通道。因此, 将液体配制成具有适当的粘度、亲水性或疏水性。在一些实施方式中, 液体可以包括一种或多种表面活性剂、洗涤剂、乳化剂、增溶剂, 以便以快速和可重复的方式提供微通道的可接受/最佳填充。在一些实施方式中, 液体包括以下中的一种或多种: 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)、苜索氯铵 (BZT)、5-溴-5-硝基-1,3-二噁烷、二甲基双十八烷基氯化铵、十六烷基三甲基溴化铵、双十八烷二甲基基溴化铵 (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、葡萄糖苷烷基醚、聚氧乙烯二醇辛基酚醚 (如曲通X-100)、聚氧乙烯乙二醇烷基酚醚、甘油烷基酯、聚氧乙烯二醇脱水山梨糖醇烷基酯 (例如, 聚山梨醇酯)、脱水山梨糖醇烷基酯、椰油酰胺MEA、椰油酰胺DEA、十二烷基二甲基氧化胺、聚乙二醇和聚丙二醇的嵌段共聚物和/或聚乙氧基化牛脂胺 (POEA)。

[0046] 在一些实施方式中, 液体包含调整浓度的吐温 (例如, 吐温-20) 和牛血清白蛋白 (BSA)。在一些实施方式中, 设计吐温 (例如, 吐温-20) 和BSA的浓度以提供溶液在微通道长度上的高效流动。在一些实施方式中, 设计吐温 (例如, 吐温-20) 和BSA的浓度以提供通过微流体通道的膜的活化/润湿。在一些实施方式中, 液体包含0.01%至5%的BSA。在一些实施方式中, 液体包含0.01%至5%的吐温。

[0047] 抗体溶液中的抗体可以是多克隆和/或单克隆抗体或具有不同抗原特异性或其功能片段的单克隆抗体的混合物。抗体也可以是一种或多种一抗和/或二抗。

[0048] 再次参考图1, 光源106被配置为照射膜102的表面。根据待检测的信号, 光源106可以提供从紫外范围到远红外范围的光。示例性光源包括激光器和发光二极管。在一些实施方式中, 光源106可以提供多个波长范围的光。在一些实施方式中, 光源106被配置为通过透射照射膜102。在其他实施方式中, 光源106被配置为通过落射照射膜102。

[0049] 检测器108被配置为通过光学可检测的蛋白质120和/或标记的靶蛋白质122来检测从膜102的表面发射的光。在一些实施方式中, 通过比色、荧光、磷光或化学发光检测来实现检测。在一些实施方式中, 通过诸如通过摄影或电子检测器的成像来实现检测。示例性电子检测器包括光电二极管、电荷耦合器件 (CCD) 检测器或互补金属氧化物半导体 (CMOS) 检测器。

[0050] 来自检测器108的模拟信号由模拟-数字转换器110数字化。数字化信号由微处理器112处理以获得存储在存储器114中和/或显示在可选显示器116上的检测光的至少一个值或强度。

[0051] 通过使用适当的电子元件和软件,系统100可被编程为知晓膜102表面上的光学可检测蛋白质120和靶蛋白质122的种类和位置。

[0052] 方法

[0053] 参考图6,现在将描述使用上述系统100的用于免疫印迹的方法600。

[0054] 在示范性步骤610中,将抗体溶液施加到具有转移到其上的光学可检测蛋白质和靶蛋白质的湿膜102的表面,其中抗体溶液的施加由从光学可检测蛋白质发射的信号引导。在一些实施方式中,计算机产生所转移的光学可检测蛋白质的图谱(例如,荧光蛋白质条带和泳道的图谱),并叠加在膜102上以引导将一种或多种含一抗和/或二抗溶液的线或斑点施加到整个泳道或泳道的部分。在一个实施方式中,跨越包含靶蛋白质的分子量区域的两个荧光蛋白条带可用于引导一抗和/或二抗溶液的施加。在一些实施方式中,可以使用30千道尔顿和50千道尔顿荧光蛋白条带来引导抗体溶液施加于分子量为40千道尔顿的靶蛋白质。

[0055] 在一个实施方式中,光学可检测蛋白质120是卤代烷基化蛋白质,并且卤代烷基化色氨酸荧光用于控制一种或多种抗体溶液施加于膜102的表面。在一些实施方式中,含卤代烷基化色氨酸的蛋白质具有已知含量(或数目)的卤代烷基化色氨酸残基,当蛋白质被紫外线照射时,其产生可测量的荧光。在一些实施方式中,含有卤代烷基化色氨酸的转移蛋白质是靶蛋白质。

[0056] 在另一个实施方式中,光学可检测的蛋白质120可以是如前所述用荧光染料或比色染色剂标记的蛋白质。

[0057] 在一个实施方式中,一个或多个抗体溶液用一个或多个微流体探针200施加到膜102的表面。在另一个实施方式中,具有多于一个微通道的微流体探针400(图4)用于将一种或多种抗体溶液施加于膜102的表面。在另一个实施方式中,探针阵列500(图5)用于将一种或多种抗体溶液施加于膜102的表面。在一些实施方式中,施加后,抗体溶液可与膜102的表面上的材料孵育约5分钟至60分钟。

[0058] 方法600还可以包括在施加抗体溶液以除去未结合的抗体之后的洗涤步骤。在一些实施方式中,洗涤步骤与抗体施加步骤同时进行。在一些实施方式中,在施加抗体溶液之前将封闭溶液施加到膜102的表面。

[0059] 在示范性步骤620中,通过例如二次标记检测来检测靶蛋白质。在一些实施方式中,通过使用可检测的部分和/或标记来使与靶蛋白质结合的抗体显像和/或检测与靶蛋白质结合的抗体。可检测的部分可以由检测器108或不同的检测器检测。通过光谱、光化学、生物化学、免疫化学、电学、光学或化学技术检测合适的标记和/或部分。在一些实施方式中,一抗和/或二抗与可通过分光光度法、光化学法、生物化学法、免疫化学法、电学法、光学法或化学技术检测的检测部分连接。在一些实施方式中,使用,例如,辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶酶促进行检测。在一些实施方式中,检测部分是荧光团,包括但不限于Alexa染料(例如Alexa 350,Alexa 430等)、AMCA、BODIPY 630/650、BODIPY 650/665、BODIPY-FL、BODIPY-R6G、BODIPY-TMR、BODIPY-TRX、级联蓝、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、REG、罗丹明绿、罗丹明红、ROX、TAMRA、TET、四甲基罗丹明和/或德克萨斯红。在一些实施方式中,检测部分是红外光吸收染料,包括但不限于IRDye 800CW、IRDye 680LT、IRDye、700DX和/或IRDye 680。

[0060] 参考图7,现在将描述使用上述系统100的用于印迹(即,Southern或Northern印迹)的方法700。

[0061] 在示例性步骤700中,将核酸探针溶液施加到具有荧光标记的(例如,溴化乙锭标记的)核酸片段和转移到其上的靶核酸片段的湿膜的表面上,其中所述核酸探针溶液的施加由荧光标记的核酸片段发出的信号引导。在一些实施方式中,计算机产生转移的荧光标记的核酸片段(例如,荧光标记的核酸片段条带和泳道的图谱)的图,并叠加在膜102上以引导一种或多种核酸探针溶液的线或斑点施加至整个泳道或泳道的部分。在一个实施方式中,跨越包含靶核酸片段的分子量区域的两个荧光标记的核酸片段可用于引导核酸探针溶液的施加。在一些实施方式中,可以使用0.2千碱基和1.2千碱基荧光标记的核酸片段条带来引导核酸探针溶液施加于分子量为0.8千碱基的靶核酸片段。

[0062] 在一个实施方式中,一种或多种核酸探针溶液用一个或多个微流体探针200施加到膜702的表面。在另一个实施方式中,具有多于一个微通道的微流体探针400(图4)用于将一个或多个核酸探针溶液施加于膜102的表面。在另一个实施方式中,探针阵列500(图5)用于将一种或多种核酸探针溶液施加于膜102的表面。在一些实施方式中,在施加后,可以使核酸探针溶液与膜102的表面上的材料孵育约1分钟至60分钟。

[0063] 方法700还可包括在施加核酸探针溶液以除去未结合的材料之后的洗涤步骤。在一些实施方式中,洗涤步骤与核酸探针溶液施加步骤同时进行。在一些实施方式中,在施加核酸探针溶液之前将封闭溶液施加到膜102的表面。

[0064] 在示例性步骤720中,通过例如二次标记检测来检测靶核酸。在一些实施方式中,通过使用可检测的部分和/或标记显现和/或检测与靶核酸结合的核酸探针。可检测的部分可以由检测器108或不同的检测器检测。通过同位素、光谱、光化学、生物化学、电学、光学或化学技术检测合适的标记和/或部分。在一些实施方式中,核酸探针与可通过同位素、分光光度法、光化学法、生物化学法、电学法、光学法或化学技术检测的检测部分连接。在一些实施方式中,使用,例如,辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶酶促进行检测。在一些实施方式中,检测部分是荧光团,包括但不限于,生物素、荧光素、DNP、岩藻糖和/或德克萨斯红。

[0065] 计算机执行的方法和系统

[0066] 本文所述任何方法均可全部或部分地使用包括一个或多个处理器的计算机系统执行,可对其进行配置以完成所述方法的步骤。因此,实施方式可指向被配置以执行本文所述任意方法的步骤的计算机系统,潜在地具有执行相应步骤或相应步骤组合的不同组分。虽然以编号或有序步骤呈现,但本文所述方法的步骤可在同一时间或以不同顺序执行。此外,这些步骤的部分可与来自其他方法的其他步骤的部分联用。同样,步骤的全部或部分可以是任选的。此外,任何方法的任何步骤都可使用模块、循环或用于执行这些步骤的其他方法执行。

[0067] 在一些实施方式中,所述计算机执行方法通过计算机系统执行,该系统与能够检测膜中或膜的图像中的光学可检测蛋白质(例如,蛋白质条带)的图像扫描仪电子通讯。计算机执行方法可以检测标记的蛋白质条带,并且可以使用检测到的蛋白质条带来引导分配器的运动,因为一种或多种抗体溶液被施加到膜的表面。

[0068] 本公开还提供了一种能够执行本文所述的方法的任何一个或所有步骤的计算机产品。因此,在一些实施方式中,所述计算机产品包括非瞬时计算机可读介质,其储存用于控

制处理器执行本发明所述的一个或多个方法步骤操作的多项指令。

[0069] 图8显示示例性计算机系统800的框图,其可用于本公开实施方式的系统和方法。

[0070] 本发明提及的任何计算机系统都可利用任何适当数目的子系统。这类子系统的示例如图8中计算机设备800所示。在一些实施方式中,计算机系统包括单个计算机设备,其中子系统可以是该计算机设备的组件。在其他实施方式中,计算机系统可包括多个计算机设备,其各是子系统,具有内部组件。

[0071] 图8所示的子系统经由系统总线875互联。显示了其他子系统,如打印机874、键盘878、储存装置879、与显示适配器882偶联的监视器876等。与输入/输出(I/O)控制器871偶联的周边和I/O装置可通过任何数量的本领域已知方式(如串行端口877)连接至计算机系统。例如,串行端口877或外部接口881(例如以太网、Wi-Fi等)可用于将计算机系统800连接至广域网(如因特网)、鼠标输入装置或扫描仪。经由系统总线875的互联允许中央处理器873与各子系统连通并控制来自系统内存872或储存装置879(例如固定磁盘,如硬盘或光盘)指令的执行以及子系统间信息的交换。系统存储器872和/或储存装置879可包含计算机可读介质。本文所述的任何数据都可从一种组件输出至另一种组件并可输出至用户。

[0072] 计算机系统可包括多种相同的组件或子系统,例如通过外部接口881或通过内部接口连接在一起。在一些实施方式中,计算机系统、子系统或设备可通过网络连通。在这种情况下,可将一台计算机作为客户端并将另一台计算机作为服务器,其中各计算机都可以是同一计算机系统的部分。客户端和服务器可各包括多个系统、子系统或组件。

[0073] 应理解,上述实施方式可使用硬件(例如专用集成电路或现场可编程门阵列)以控制逻辑的形式和/或采用一般可编程的处理器使用计算机软件以模块化或集成化的方式来实施。本文中,处理器包括同一集成芯片上的多核处理器或者单个电路板上或网络连接的多个处理单元。基于本发明的公开和教导,本领域普通技术人员应知晓并理解使用硬件以及硬件和软件的组合来实施本文所述的实施方式的其他方式和/或方法。

[0074] 本申请中描述的任何软件组件或函数都可作为软件代码使用,以由处理器使用任何适当的计算机语言(如Java、C++或Perl)、使用例如常规或面向对象的技术来执行。软件代码可作为一系列指令或命令储存于计算机可读介质上用于储存和/或传输,合适的介质包括随机存取存储器(RAM)、只读存储器(ROM)、磁性介质(如硬盘或软盘)、光学介质(如光盘(CD)或DVD(数字多功能光盘)、闪速存储器等)。计算机可读介质可以是这里储存或传输装置的任意组合。

[0075] 也可使用适用于传输的载波信号经由遵循多种协议的有线、光纤和/或无线网络(包括因特网)编码和传输这类程序。同样地,可使用这类程序编码的数据信号来建立本公开的一个实施方式所述的计算机可读介质。程序代码编码的计算机可读介质可与兼容性装置打包或由其他装置单独提供(例如通过因特网下载)。任何这类计算机可读介质可存在于单个计算机产品(例如硬盘、CD或整个计算机系统)之上或之内,且可存在于系统或网络中不同计算机产品之上或之内。计算机系统可包括监视器、打印机或将本发明所述任何结果提供给用户的其他合适显示装置。

[0076] 其他公开和可要求的主题

[0077] 第1项.一种免疫印迹的方法,包括:

[0078] 将抗体溶液施加到具有转移到其上的光学可检测蛋白质和靶蛋白质的膜的表面,

其中所述抗体溶液的施加由从光学可检测蛋白质发射的信号引导;并且

[0079] 检测所述靶蛋白质。

[0080] 第2项.如第1项所述的方法,还包括洗涤步骤,其中未结合的材料从膜上除去。

[0081] 第3项.如第2项所述的方法,其中所述抗体溶液的施加步骤与所述洗涤步骤同时进行。

[0082] 第4项.如第1-3项中任一项所述的方法,其中,所述抗体溶液的施加步骤包括分配所述抗体溶液的微流体体积。

[0083] 第5项.如第1-3项中任一项所述的方法,其中,所述抗体溶液的施加步骤包括分配所述抗体溶液的亚微流体体积。

[0084] 第6项.如第1-3项中任一项所述的方法,其中,所述抗体溶液的施加步骤包括用选自下组的技术分配所述抗体溶液:流体动力学流动约束、喷墨印刷、喷雾沉积、微点滴定和微接触印刷。

[0085] 第7项.如第6项所述的方法,其中,所述抗体溶液的施加步骤包括用微流体探针分配所述抗体溶液。

[0086] 第8项.如第7项所述的方法,其中,所述微流体探针包括多个微通道。

[0087] 第9项.如第7项或第8项所述的方法,其中所述微流体探针是微流体探针的阵列。

[0088] 第10项.如前述第1-9项中任一项所述的方法,其中所述抗体溶液的施加步骤包括将抗体溶液分配到所述膜的表面上的至少一个离散路径中。

[0089] 第11项.如第10项所述的方法,其中所述路径跨越一个或多个蛋白质条带的泳道的长度。

[0090] 第12项.如第10项所述的方法,其中所述路径为25纳米至500微米宽。

[0091] 第13项.如前述第1-9项中任一项所述的方法,其中所述抗体溶液的施加步骤包括将2种抗体溶液各自分配到所述膜的表面上的泳道上至少一个离散路径中。

[0092] 第14项.如前述第1-9项中任一项所述的方法,其中所述抗体溶液的施加步骤包括将抗体溶液分配到至少一个离散斑点中。

[0093] 第15项.如前述第1-9项中任一项所述的方法,其中所述抗体溶液的施加步骤包括分配一抗溶液和二抗溶液。

[0094] 第16项.如前述第1-9项中任一项所述的方法,其中所述膜包含选自下组的材料:聚偏二氟乙烯、硝酸纤维素、尼龙和聚砜。

[0095] 第17项.如前述第1-16项中任一项所述的方法,其中转移到膜上的光学标记的蛋白质用选自下组的物质标记:荧光染料,比色染料和卤代烷烃。

[0096] 第18项.如前述第1-17项中任一项所述的方法,还包括在施加抗体溶液之前将封闭溶液施加到膜的表面。

[0097] 第19项.一种免疫印迹系统,其包括:

[0098] 具有转移到其上的光学可检测的蛋白质的膜;

[0099] 配置为分配抗体溶液的分配器;

[0100] 配置为检测所述光学可检测的蛋白质的检测器;

[0101] 处理器;和

[0102] 存储器,其包括用于存储指令的数据存储单元,所述指令可由所述处理器执行,并

且配置所述系统以根据由所述检测器检测到的光学可检测蛋白质来分配所述抗体溶液。

[0103] 第20项.如第19项所述的免疫印迹系统,其中所述检测器还配置成检测靶蛋白质。

[0104] 第21项.如第19项或第20项所述的免疫印迹系统,还包括配置成检测靶蛋白质的第二检测器。

[0105] 第22项.如第19-21项中任一项所述的免疫印迹系统,其中所述分配器选自下组:流体动力学流动约束分配器、喷墨打印机、喷雾沉积分配器、微型点阵器和微接触式打印机。

[0106] 第23项.如第19-22项中任一项所述的免疫印迹系统,其中所述分配器是微流体探针。

[0107] 第24项.如第23项所述的免疫印迹系统,其中,所述微流体探针包括多个微通道。

[0108] 第25项.如第23项所述的免疫印迹系统,其中所述微流体探针是微流体探针的阵列。

[0109] 第26项.一种免疫印迹的方法,包括:

[0110] 将抗体溶液施加到具有转移到其上的含卤代烷基化色氨酸的蛋白质和靶蛋白质的膜的表面,其中所述抗体溶液的施加由所述含卤代烷基化色氨酸的蛋白质的荧光引导;并且

[0111] 检测所述靶蛋白质。

[0112] 第27项.一种免疫印迹系统,其包括:

[0113] 具有转移的含卤代烷基化色氨酸的蛋白质的膜;

[0114] 配置为分配抗体溶液的分配器;

[0115] 配置为检测所述含卤代烷基化色氨酸的蛋白质的检测器;

[0116] 处理器;和

[0117] 存储器,其包括用于存储指令的数据存储单元,所述指令可由所述处理器执行,并且配置所述系统以根据由所述检测器检测到的含卤代烷基化色氨酸的蛋白质来分配所述抗体溶液。

[0118] 第28项.一种印迹方法,包括:

[0119] 将核酸探针施加到具有转移至其上的荧光标记的核酸片段和靶核酸片段的膜的表面,其中所述核酸探针的施加由从所述荧光标记的核酸片段发出的信号引导;并且

[0120] 检测所述靶核酸片段。

[0121] 第29项.如第28项所述的方法,还包括洗涤步骤,其中未结合的材料从膜上除去。

[0122] 第30项.如第29项所述的方法,其中所述探针的施加步骤与所述洗涤步骤同时进行。

[0123] 第31项.如第28-30项中任一项所述的方法,其中,所述核酸探针的施加步骤包括分配所述探针的微流体体积。

[0124] 第32项.如第28-30项中任一项所述的方法,其中,所述核酸探针的施加步骤包括分配所述探针的亚微流体体积。

[0125] 第33项.如第28-32项中任一项所述的方法,其中,所述核酸探针的施加步骤包括用选自下组的技术分配所述核酸探针:流体动力学流动约束、喷墨印刷、喷雾沉积、微点滴定和微接触印刷。

- [0126] 第34项.如第28-33项中任一项所述的方法,其中,所述核酸探针的施加步骤包括用微流体探针分配所述核酸探针。
- [0127] 第35项.如第34项所述的方法,其中,所述微流体探针包括多个微通道。
- [0128] 第36项.如第34项所述的方法,其中所述微流体探针是微流体探针的阵列。
- [0129] 第37项.如前述第28-36项中任一项所述的方法,其中所述核酸探针的施加步骤包括将所述核酸探针分配到所述膜的表面上的至少一个离散路径中。
- [0130] 第38项.如第37项所述的方法,其中所述路径跨越一个或多个蛋白质条带的泳道的长度。
- [0131] 第39项.如第37项所述的方法,其中所述路径为25纳米至500微米宽。
- [0132] 第40项.如权利要求28所述的方法,其中所述核酸探针的施加步骤包括将2种核酸探针各自分配到所述膜的表面上的泳道上的离散路径中。
- [0133] 第41项.如第28-36项中任一项所述的方法,其中,所述核酸探针的施加步骤包括将所述核酸探针分配到至少一个离散斑点中。
- [0134] 第42项.如前述第28-41项中任一项所述的方法,其中所述膜包含选自下组的材料:聚偏二氟乙烯、硝酸纤维素、尼龙和聚砜。
- [0135] 第43项.如前述第28-42项中任一项所述的方法,其中转移到所述膜上的荧光标记的核酸片段用溴化乙锭标记。
- [0136] 第44项.如前述第28-43项中任一项所述的方法,还包括在施加所述核酸探针之前将封闭溶液施加到所述膜的表面。
- [0137] 第45项.一种印迹系统,其包括:
- [0138] 具有转移到其上的荧光标记的核酸片段的膜;
- [0139] 配置为分配核酸探针的分配器;
- [0140] 配置为检测所述荧光标记的核酸片段的检测器;
- [0141] 处理器;和
- [0142] 存储器,其包括用于存储指令的数据存储单元,所述指令可由所述处理器执行,并且配置所述系统以根据由所述检测器检测到的所述荧光标记的核酸片段来分配所述核酸探针。
- [0143] 第46项.如第45项所述的印迹系统,其中所述检测器还配置成检测靶核酸片段。
- [0144] 第47项.如第45项或第46项所述的印迹系统,还包括配置成检测靶核酸片段的第二检测器。
- [0145] 第48项.如第45-47项中任一项所述的印迹系统,其中所述分配器选自下组:流体动力学流动约束分配器、喷墨打印机、喷雾沉积分配器、微型点阵器和微接触式打印机。
- [0146] 第49项.如第45-48项中任一项所述的印迹系统,其中所述分配器是微流体探针。
- [0147] 第50项.如第49项所述的印迹系统,其中,所述微流体探针包括多个微通道。
- [0148] 第51项.如第49项或第50项所述的印迹系统,其中所述微流体探针是微流体探针的阵列。

实施例

- [0149] 实施例1:使用微流体探针的免疫印迹

[0150] 以下描述了使用微流体探针检测单一印迹上脑组织中的四种不同蛋白质的多重western印迹的一种提出的方法。

[0151] 该方法的第一步涉及使用裂解缓冲液(50mM Tris-HCl pH 8.0, 150mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% 脱氧胆酸钠, 0.1% SDS, 补充有磷酸酶和蛋白酶抑制剂)从12只年龄相匹配的正常或阿尔茨海默氏病小鼠的脑组织进行蛋白质提取。取20 μ g的各样品,加入等体积的2 \times 利姆里样品缓冲液(4% SDS, 10% 2-巯基乙醇, 20% 甘油, 0.004% 溴酚蓝, 125mM Tris-HCl, pH 6.8)。将样品缓冲液中的各细胞裂解物在95 $^{\circ}$ C下加热5分钟。将蛋白质样品和适当的蛋白质标记物加载到4-15% Bio-Rad TGX免染CriterionTM凝胶12+2孔中。使用Tris-甘氨酸运行缓冲液(25mM Tris, 190mM 甘氨酸, 0.1% SDS, pH 8.3)在100V下运行凝胶约60分钟。

[0152] 当电泳步骤完成时,从CriterionTM池中取出凝胶盒,并从盒中取出凝胶。将凝胶放在Bio-Rad ChemiDocTM Touch成像仪的UV样品盘上。打开UV光以激活凝胶中的卤代烷基化蛋白质1分钟,以便在电印迹后可以荧光检测蛋白条带。从托盘中取出凝胶,并用低荧光PVDF膜组装转移夹心物。将夹心置于Bio-Rad Trans-Blot Turbo系统中,并在25V下转移7分钟。

[0153] 蛋白质转移完成后,将低荧光PVDF膜印迹置于容器中的封闭缓冲液(3% 牛血清白蛋白, 20mM Tris pH 7.5, 150mM NaCl, 0.1% 吐温20)中,并固定于微流体探针免疫印迹系统中的X-Y-Z平台。拍摄印迹的荧光图像以定位蛋白质泳道和条带。计算机使用蛋白质泳道和条带的荧光图像产生叠加在膜上的图,以自动驱动微流体探针将4种不同的抗体溶液(每种使用不同的微流体探针)分配到各样品通道上。将各抗体溶液分配在25纳米-200微米宽的线上。通过以下方式制备抗体溶液:1)在ReadyTector[®]一体式缓冲液(CONDOR生物科学公司(CONDOR BioScience))中以1:50稀释Tau (Tau46)小鼠单克隆抗体#4019(细胞信号转导技术公司(Cell Signaling Technology));2)在ReadyTector[®]一体式缓冲液中以1:50稀释Phospho-Tau (Ser396) (PHF13)小鼠单克隆抗体#9632(细胞信号转导技术公司);3)在ReadyTector[®]一体式缓冲液中以1:50稀释 α -突触核蛋白(Syn204)小鼠mAb#2647(细胞信号转导技术公司);4)在ReadyTector一体式缓冲液中以1:50稀释APP/ β -淀粉样蛋白(NAB228)小鼠mAb#2450(细胞信号转导技术公司)。ReadyTector[®]一体式缓冲液含有HRP偶联的山羊抗小鼠抗体。当四种抗体溶液中的每一种都分配在凝胶的12条通道中时,使用微探针通过分配TBS缓冲液(20mM Tris pH 7.5, 150mM NaCl)来洗涤印迹。

[0154] 接下来从微流体探针免疫染色系统中除去印迹,并在TBS缓冲液中再漂洗一次以除去封闭缓冲液中的过量抗体和牛血清白蛋白。然后将印迹用预混合的Bio-Rad Clarity ECL底物孵育5分钟。将得到的印迹放置在ChemiDocTM Touch系统的Chemi托盘上以获得化学发光图像。使用Bio-Rad Image Lab软件测量靶蛋白质条带的强度,并对免染印迹图像上测量的总加载对照进行归一化。

[0155] 实施例2:使用常规方法的免疫印迹

[0156] 以下描述了检测单一印迹上的脑组织中的四种不同蛋白质的典型常规western印迹方法。

[0157] 常规western印迹方法的第一步涉及使用裂解缓冲液(50mM Tris-HCl pH 8.0, 150mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% 脱氧胆酸钠, 0.1% SDS, 补充有磷酸酶和蛋白酶抑制剂)从12只年龄相匹配的正常或阿尔茨海默氏病小鼠的脑组织进行蛋白质提取。取20 μ g的各样品,加入等体积的2 \times 利姆里样品缓冲液(4% SDS, 10% 2-巯基乙醇, 20% 甘油, 0.004% 溴酚蓝,

125mM Tris-HCl, pH6.8)。将样品缓冲液中的各细胞裂解物在95℃下加热5分钟。将蛋白质样品和适当的蛋白质标记物加载到4-15%Bio-Rad TGX Critrion™凝胶12+2孔中。使用Tris-甘氨酸运行缓冲液(25mM Tris, 190mM甘氨酸, 0.1%SDS, pH 8.3)在100V下运行凝胶约60分钟。

[0158] 电泳完成后,将凝胶置于1×转移缓冲液(25mM Tris, 190mM甘氨酸, 20%甲醇)中10-15分钟。使用常规PVDF膜组装转移夹心物,确保夹心物中没有圈留气泡。印迹应在阳极上并且凝胶应在阴极上。将夹心盒放入转移罐中,并将冰块放在罐中。在冷室中以10mA的恒定电流转移过夜。

[0159] 当蛋白质转移完成时,将PVDF膜印迹置于TBST(20mM Tris pH 7.5, 150mM NaCl, 0.1%吐温20)中的3%BSA中,在室温下放置1小时。在4℃下,在10ml Tau(Tau46)小鼠单克隆抗体溶液中将印迹孵育过夜。抗体在封闭缓冲液中以1:1000稀释。在施加HRP偶联的山羊抗小鼠抗体溶液1小时之前,在室温下,用TBST冲洗印迹5次持续5分钟。用TBST再次冲洗印迹5次持续5分钟。

[0160] 当抗体孵育步骤完成时,将化学发光底物施加于印迹。使用Bio-Rad ChemiDoc™ Touch系统捕获化学发光信号。使用图像分析软件读取靶蛋白质的条带强度。

[0161] 为了检测膜上的第二蛋白质靶标,在50℃下在搅拌下在剥离缓冲液(20ml 10% SDS, 12.5ml 0.5M Tris HCl, 67.5ml超纯水, 0.8mlβ-巯基乙醇)中剥离印迹,持续至多45分钟。然后将膜在水中冲洗1小时。重复上述的抗体孵育和成像步骤以施加Phospho-Tau(Ser396)(PHF13)小鼠单克隆抗体以检测磷酸化tau蛋白。

[0162] 剥离并再探测印迹三次以检测以下靶标:使用小鼠mAb#2647(1:1000,细胞信号转导技术公司)针对α-突触核蛋白,使用小鼠mAb#2450(1:1000,细胞信号转导技术公司)针对APP/β-淀粉样蛋白,和使用小鼠mAb#3700(1:1000,细胞信号转导技术公司)针对管家加载对照蛋白β-肌动蛋白。使用Bio-Rad Image Lab软件从化学发光印迹图像上测量感兴趣的蛋白质的强度,并针对管家蛋白质加载对照β-肌动蛋白标准化。

[0163] 实施例3:常规和基于微流体探针的免疫印迹的比较

[0164] 基于微流体探针的免疫印迹与常规的Western印迹相比具有以下主要益处/差异:

[0165] 1) 自动抗体探测步骤:微流体探针免疫印迹系统自动分配抗体溶液至各样品泳道,并代替常规方法中超过10个步骤的手动更换缓冲液的步骤。免手动程序使科学家从漫长操作方案中释放出来,使他们能够专注于其他项目。它提高了实验室的生产力。

[0166] 2) 重现性:自动抗体探测程序提供了抗体分配中的空间、时间和浓度的精确度,从而更好地控制抗体-抗原相互作用的动力学。与传统操作方案相比,这转化为重现性更高的数据。

[0167] 3) 无剥离和再探测的多重化:微流体探针在各样品通道上的离散路径中提供不同的抗体。针对不同靶标的抗体不相互混合,消除了与常规多重免疫测定相关的交叉反应性问题,以及剥离和再探测的需要。

[0168] 4) 节约抗体:微流体探针在各样品泳道上25纳米至200微米宽的路径中分配抗体,而不是整个膜印迹。这可能会降低每次实验的抗体消耗。

[0169] 实施例4:使用微流体探针和模型靶抗原的免疫印迹

[0170] 该实施例说明使用转移到Western印迹膜上的光学可检测的蛋白质以引导将一抗

溶液施加于其上转移有模型靶抗原(例如,靶蛋白质)的印迹膜的表面。通过微流体探针施加一抗在与靶抗原相邻的泳道中由光学可检测的蛋白质标准物引导。

[0171] 对于十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),使用具有10孔的Bio-Rad 4-20% **Mini-PROTEAN®** TGX蛋白凝胶(目录号4561094)。使用人血清白蛋白(hSA)蛋白质(10mg/ml Rockland,目录号009-0133)的储备溶液作为模型靶抗原。hSA在缓冲液中稀释7500倍。缓冲液包括具有355mM 2-巯基乙醇(Bio-rad目录号161-0710)和磷酸盐缓冲盐水(PBS)的标准利姆里样品缓冲液(Bio-Rad目录号161-0747)。将稀释的hSA样品通过加热至95°C预处理10分钟。对于凝胶,将15ul加热的hSA样品加载到偶数泳道(总量为20ng的hSA)中,而奇数泳道加载分子量梯标(Precision Plus Protein™ Dual Color Standards, Bio-Rad目录号1610394)。使用Tris-甘氨酸运行缓冲液(25mM Tris,109mM甘氨酸,0.1% SDS,pH 8.3),使用Bio-Rad **Mini-PROTEAN®** Tetra Cell在200V下进行电泳分离约40分钟。电泳分离后,用蒸馏水洗涤凝胶。

[0172] 凝胶电泳后,从凝胶盒中取出凝胶,使用Bio-Rad Trans-Blot Turbo系统和在25V下7分钟的转移时间,将蛋白条带转移到低荧光PVDF膜(来自Bio-Rad **Trans-Blot®** Turbo™ RTA Mini LF PVDF转移试剂盒,目录号1704274)。PVDF膜先前已经通过用99%甲醇处理该膜而被活化。蛋白质转移后,将PVDF膜浸没、脱脂干燥牛奶封闭剂(Bio-Rad目录号170-6404)、5%TBS缓冲液(目录号170-6435)和0.1%吐温20的封闭溶液(或TBST)中缓慢摇晃1小时。

[0173] 如图9A所示,使用侧接具有hSA的泳道的预染蛋白质标准物在观察确定用微流体探针(IBM研究公司,苏黎世)在哪里向印迹膜施加250µg/ml一抗(用封闭溶液1:4稀释的兔抗-hSA多克隆;Rockland目录号600-401-033)。在与标记物4和标记物5之间的区域中hSA条带的估计位置垂直的线上施加一抗。膜上方的微流体探针的高度为80微米,并且含有稀释的一抗的处理液的速度为0.1毫米/秒或0.05毫米/秒。根据处理液的速度,所分配的一抗线的宽度为约50纳米至约200微米。在施加一抗期间将膜浸没封闭溶液(即浸入液)中。将一抗从注射通道注入浸没液体中和含有hSA条带的泳道的印迹膜的表面上,与浸没液体混合的一抗被吸回吸出通道(aspiration channel),从而使施加一抗和随后的去除未结合的一抗是同时进行的。

[0174] 在用微流体探针将一抗施加于hSA条带后,印迹在TBST中洗涤三次,每次持续5分钟(共15分钟)。然后将印迹浸入30µg/ml二抗(1.5mg/ml FITC偶联的抗兔小鼠多克隆抗体,在封闭溶液中以1:50稀释;Jackson目录号111-095-003)的溶液中。印迹在TBST中再次洗涤3次,每次持续5分钟。如图9B所示,使用荧光素模式(激发-蓝色落射光;发射530/28;曝光时间1秒),用Bio-Rad ChemiDoc™ MP成像器检测并成像hSA条带。图9C显示了在图9B中成像的带的强度分布(例如,随着扫描距离变化的相对信号强度)。使用ImageJ软件(开源)测定强度分布。

[0175] 图9B和9C所示的结果表明,在印迹膜上与靶抗原相邻的泳道中的光学可检测的蛋白质(例如,预染蛋白质标准物)可用于引导将一抗溶液施加于印迹膜。一抗仅应用于泳道的部分。

[0176] 实施例5:使用微流体探针和与光学可检测的蛋白质混合的模型靶抗原的免疫印迹

[0177] 该实施例说明了引导将一抗溶液施加于具有转移到其上的光学可检测的蛋白质和靶抗原的印迹膜的表面。由光学可检测的蛋白质标准物引导通过微流体探针施加一抗，所有这些蛋白质标准物都在印迹膜上相同泳道中。

[0178] 将具有7Gm IPG/制备孔的Bio-Rad 4-20% Mini-PROTEAN®TGX免染™蛋白质凝胶(目录号4568091)用于SDS-PAGE。使用hSA蛋白质(10mg/ml Rockland, 目录号009-0133)的储备溶液作为模型靶抗原。hSA在缓冲液中稀释7500倍。缓冲液包括具有355mM 2-巯基乙醇(Bio-rad目录号161-0710)和PBS的标准利姆里样品缓冲液(Bio-Rad目录号161-0747)。将稀释的hSA样品通过加热至95℃预处理10分钟。对于凝胶,将400μl加热的hSA样品与30μl分子量梯标(Precision Plus Protein™ Dual Color Standards, Bio-Rad目录号1610394)混合,并将混合物加载到孔中。使用Tris-甘氨酸运行缓冲液(25mM Tris, 109mM甘氨酸, 0.1%SDS, pH 8.3),使用Bio-Rad Mini-PROTEAN®Tetra Cell在200V下进行电泳分离约40分钟。电泳分离后,用蒸馏水洗涤凝胶。

[0179] 凝胶电泳后,从凝胶盒中取出凝胶,使用Bio-Rad Trans-Blot Turbo系统和在25V下7分钟的转移时间,将蛋白条带转移到低荧光PVDF膜(来自Bio-Rad Trans-Blot®Turbo™ RTA Mini LF PVDF转移试剂盒, 目录号1704274)。PVDF膜先前已经通过用99%甲醇处理该膜而被活化。蛋白质转移后,将PVDF膜浸入、脱脂干燥牛奶封闭剂(Bio-Rad目录号170-6404)、5%TBS缓冲液(目录号170-6435)和0.1%吐温20的封闭溶液(或TBST)中缓慢摇晃1小时。

[0180] 使用与hSA相同泳道中的预染蛋白质标准物在观察确定用微流体探针(IBM研究公司, 苏黎世)在哪里向印迹膜施加250μg/ml一抗(用封闭溶液1:4稀释的兔抗-hSA多克隆; Rockland目录号600-401-033)。在与标记物4和标记物5之间的区域中hSA条带的估计位置垂直的线上施加一抗。由于制备孔用于加载预染蛋白质标准物和hSA的混合物,获得标准物和hSA的7cm宽带,使得用微流体探针多次施加一抗。在图10A中,随着扫描线移动到探针的实际路径的左侧以避免隐藏信号,显示探针的路径。膜上方的微流体探针的高度为80微米,并且含有稀释的一抗的处理液体的速度为0.05毫米/秒。分配的一抗的线的宽度为约200微米。在施加一抗期间将膜浸入封闭溶液(即浸没液体)中。将一抗从注射通道注入浸没液体中和含有hSA条带的泳道的印迹膜的表面上,与浸没液体混合的一抗被吸回吸出通道,从而使施加一抗和随后的去除未结合的一抗是同时进行的。

[0181] 在用微流体探针将一抗施加于hSA条带后,印迹在TBST中洗涤三次,每次持续5分钟(共15分钟)。然后将印迹浸入30μg/ml二抗(1.5mg/ml FITC偶联的抗兔小鼠多克隆抗体,在封闭溶液中以1:50稀释; Jackson目录号111-095-003)的溶液中。印迹在TBST中再次洗涤3次,每次持续5分钟。如图10A所示,使用荧光素模式(激发-蓝色落射光;发射530/28),用Bio-Rad ChemiDoc™ MP成像器检测并成像hSA条带。图10B显示了图10A中成像的带的强度分布。使用ImageJ软件(开源)测定强度分布。

[0182] 图10A和10B所示的结果表明,在印迹膜上与靶抗原相同的泳道中的光学可检测的蛋白质(例如,预染蛋白质标准物)可用于引导将一抗溶液施加于印迹膜。

[0183] 当术语“包含”及其各种变体例如“包括”和“含有”位于叙述步骤或要素之前的时候,是用来表示添加其它的步骤或要素是任选的,并且是非排它性的。本说明书中引用的所有专利、专利申请和其它公开的参考材料都通过引用全文结合入本文中。当本说明书的内

容与本发明引用的任何参考材料或任何现有技术之间存在矛盾之处的时候,以本说明书为准。所述矛盾之处包括现有技术对词或词组的定义与本说明书对相同的词或词组明确给出的定义之间的差异。

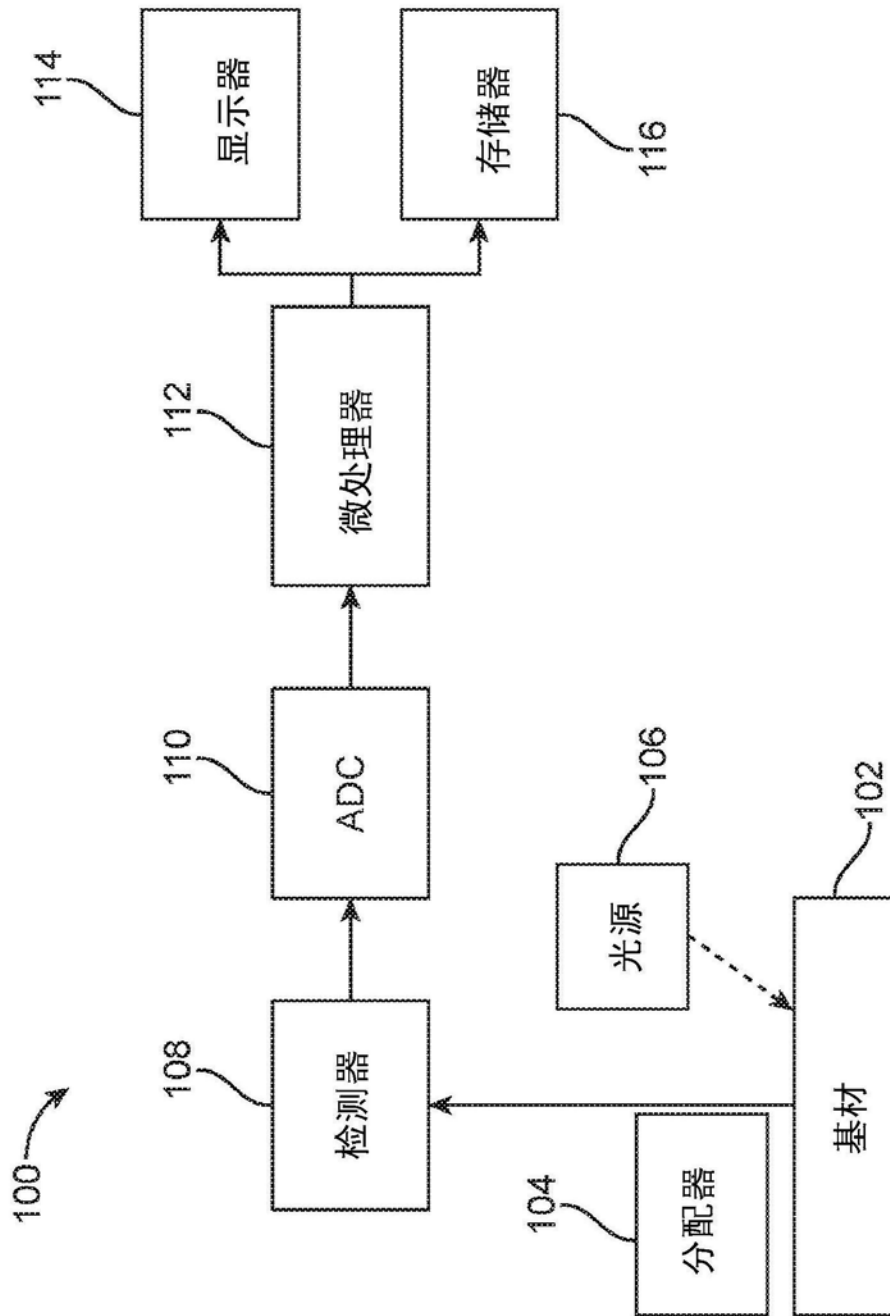


图1

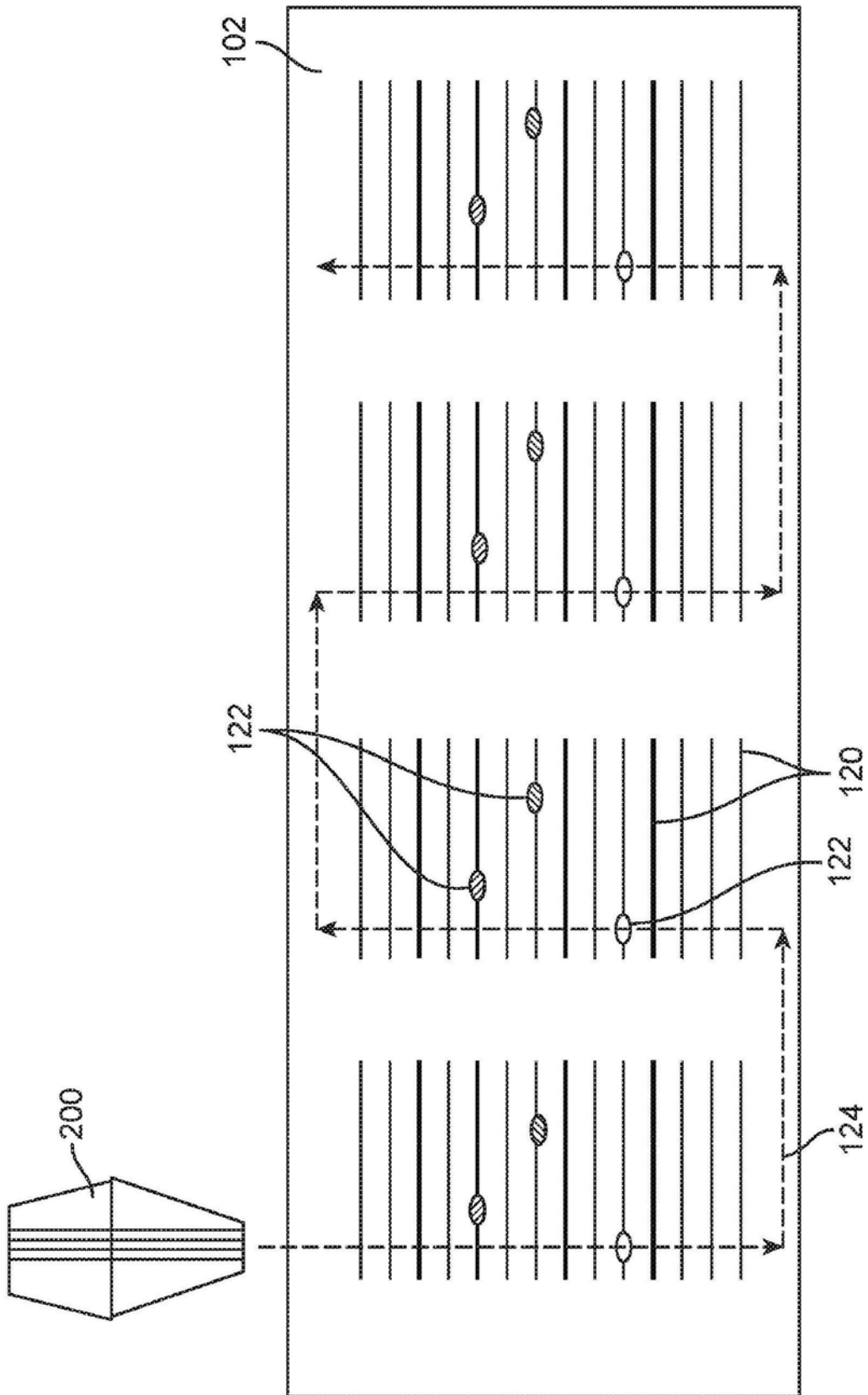


图2

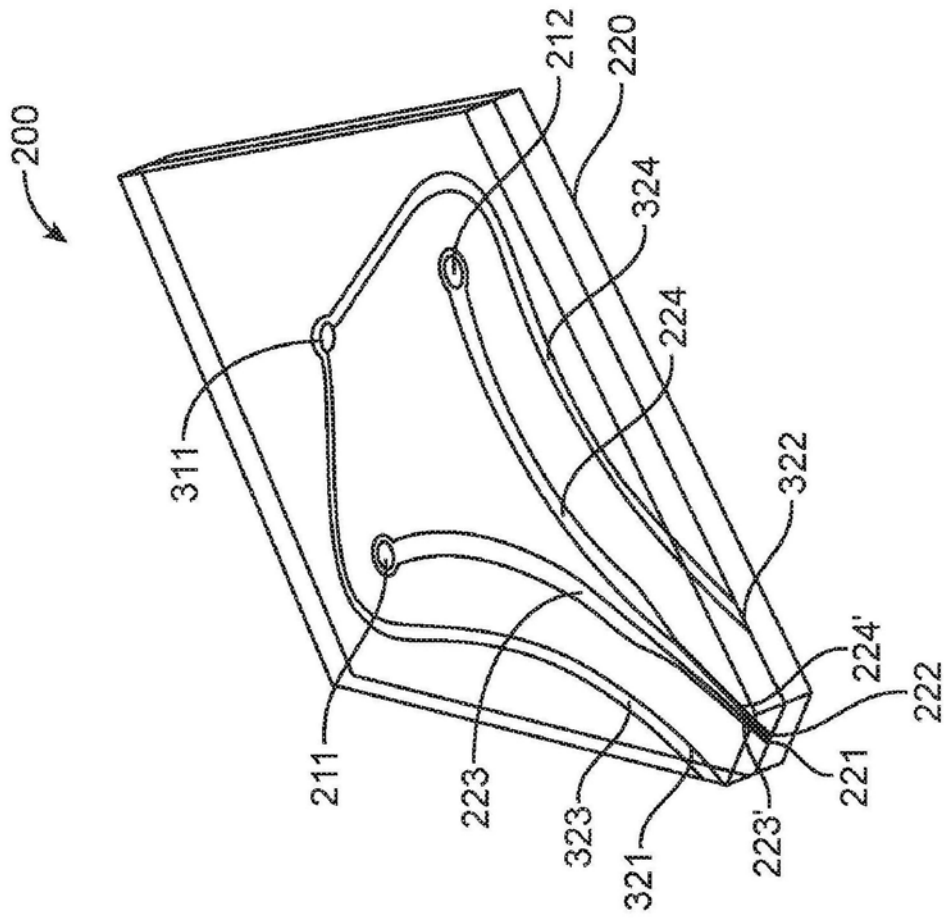


图3A
(现有技术)

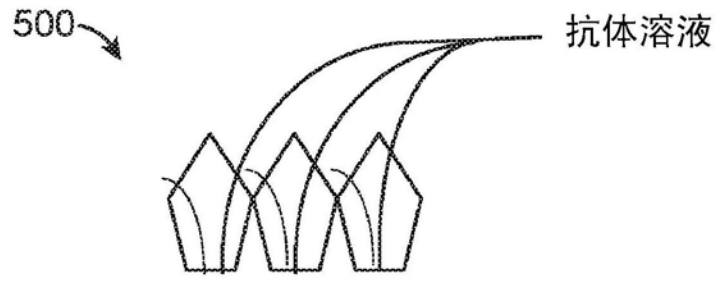


图5

600

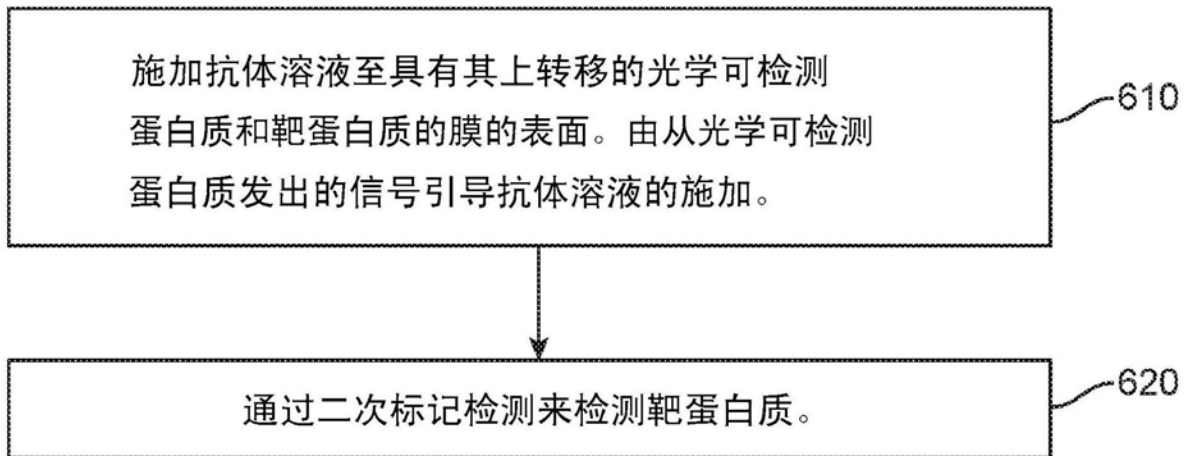


图6

700 →

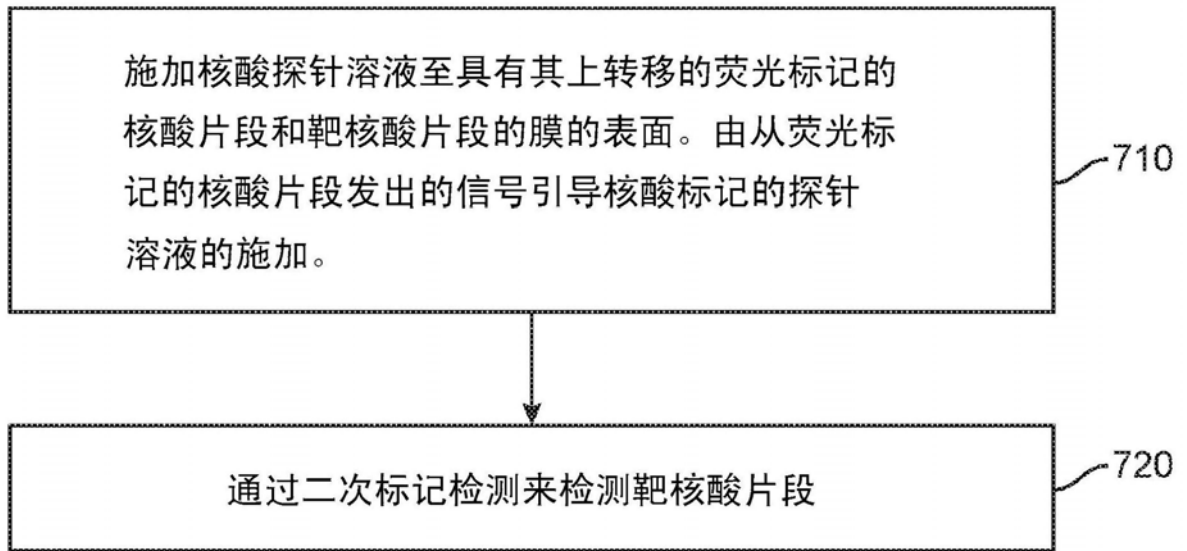


图7

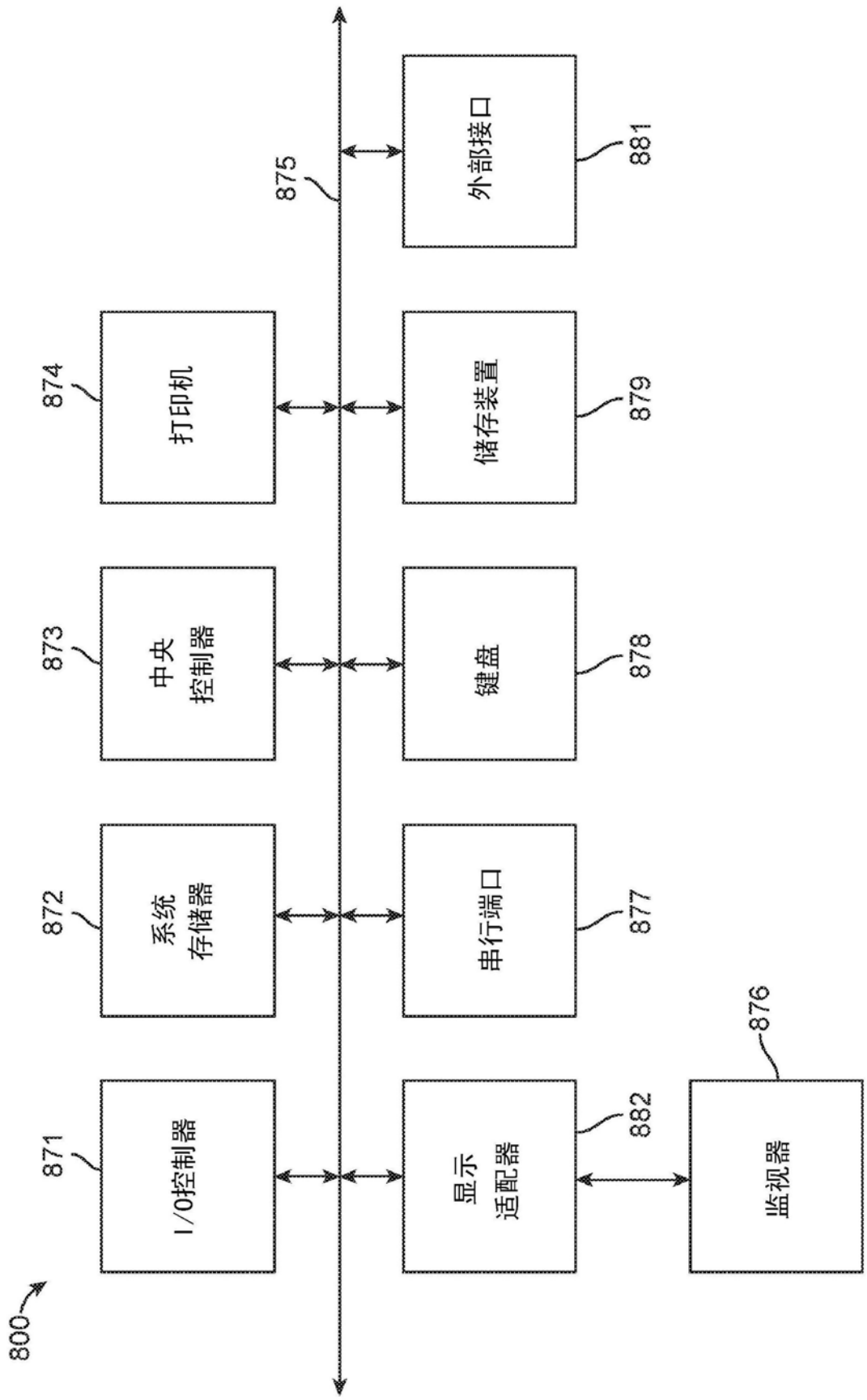


图8

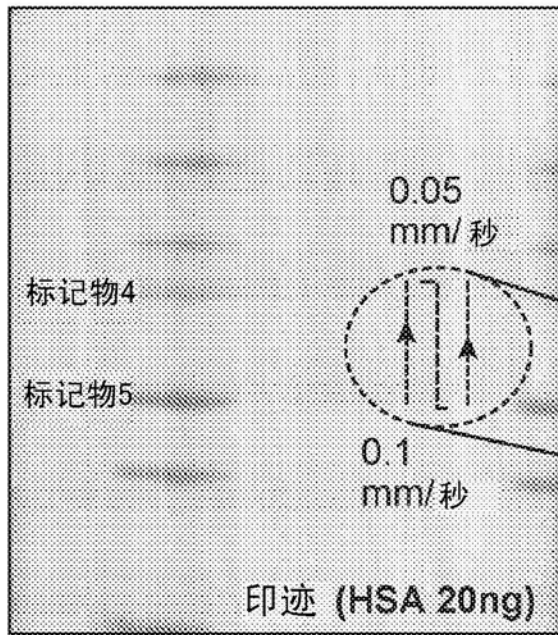


图 9A

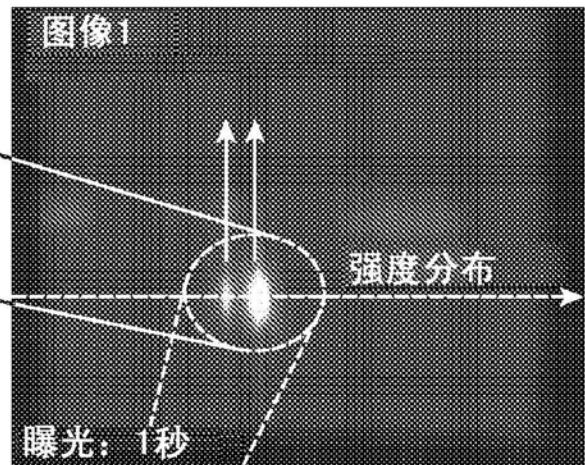


图 9B

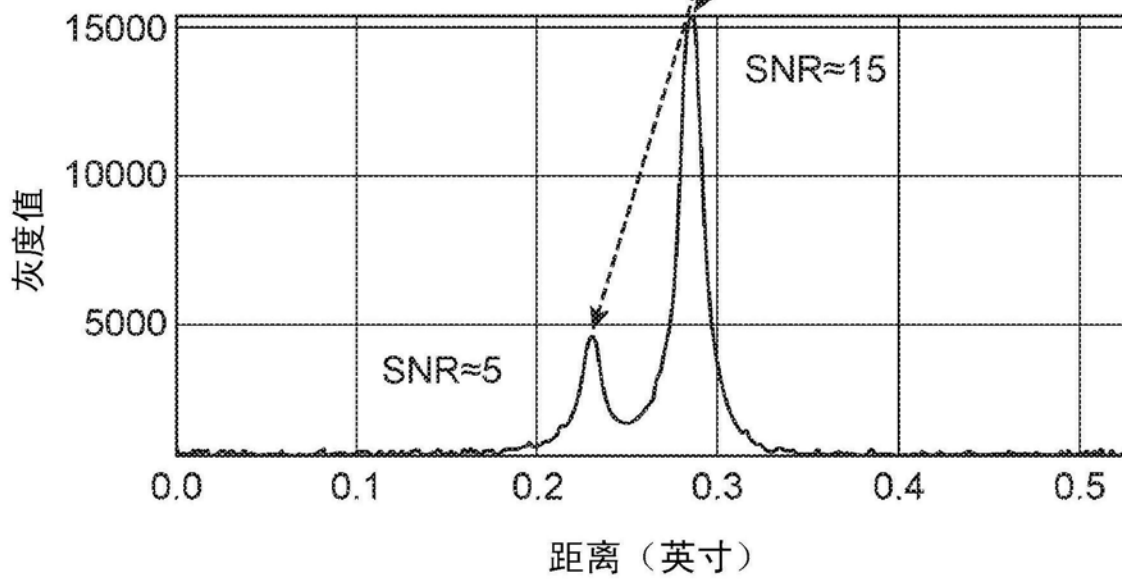


图 9C

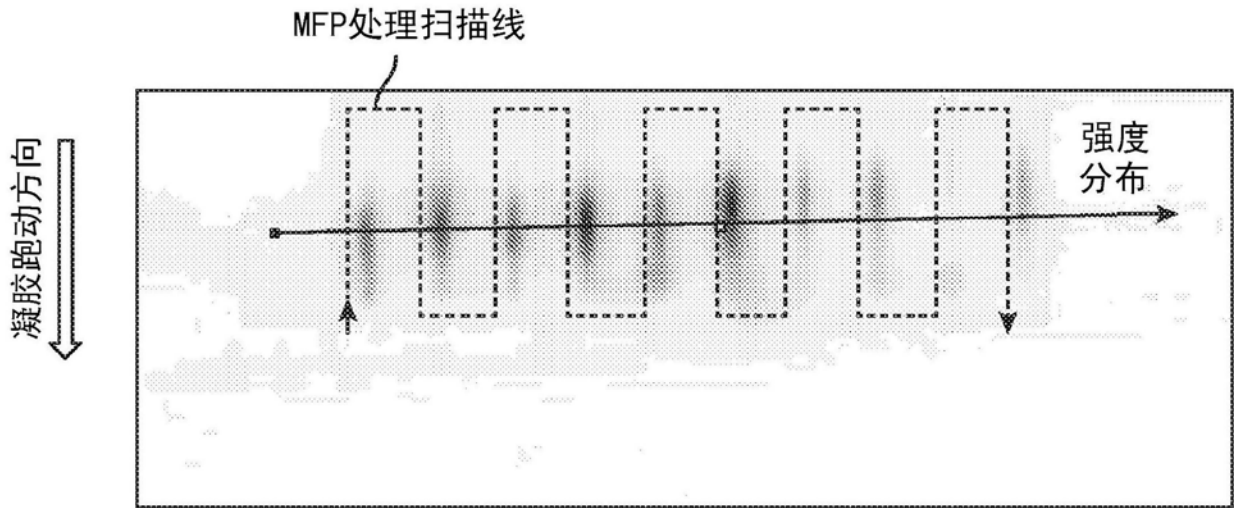


图10A

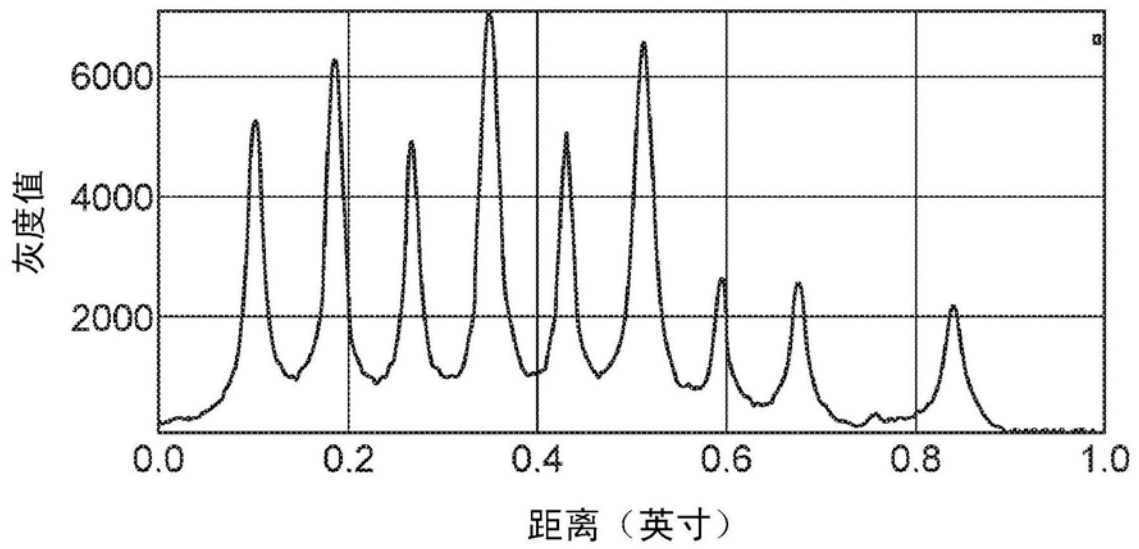


图10B

专利名称(译)	免疫印迹系统和方法		
公开(公告)号	CN107209183B	公开(公告)日	2019-09-24
申请号	CN201680006863.7	申请日	2016-01-21
[标]申请(专利权)人(译)	比奥-雷德实验室股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	生物辐射实验室股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	生物辐射实验室股份有限公司		
[标]发明人	L·宁		
发明人	L·宁		
IPC分类号	G01N33/561 G01N33/53 G01N33/49		
CPC分类号	G01N33/54306		
代理人(译)	陈扬扬		
审查员(译)	周洋		
优先权	62/107131 2015-01-23 US		
其他公开文献	CN107209183A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

提供了免疫印迹系统和方法。在一个实施方案中，可通过以下来实现该方法：将抗体溶液施加到具有转移到其上的光学可检测蛋白质和靶蛋白质的膜的表面，其中抗体溶液的施用由从光学可检测蛋白质发射的信号引导；并检测靶蛋白质。也描述并显示了系统和其他方法。

