



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109439517 A

(43)申请公布日 2019.03.08

(21)申请号 201811604174.3

G01N 33/53(2006.01)

(22)申请日 2018.12.26

(71)申请人 天康生物股份有限公司

地址 830000 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐
市高新技术产业开发区长春南路528
号

(72)发明人 贺笋 王遵宝 徐龙飞 潘晓梅
李俊辉 李延涛 侯玉珍 田晓艳

(74)专利代理机构 北京超凡志成知识产权代理
事务所(普通合伙) 11371

代理人 李丙林

(51)Int.Cl.

C12M 1/00(2006.01)

C12M 1/38(2006.01)

C12Q 1/6834(2018.01)

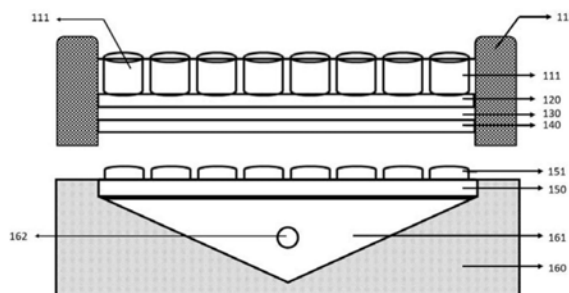
权利要求书2页 说明书11页 附图3页

(54)发明名称

斑点杂交反应装置及其应用和免疫印迹检测方法

(57)摘要

本发明提供了一种斑点杂交反应装置及其应用和免疫印迹检测方法,涉及分子杂交实验装置技术领域。该斑点杂交反应装置包括加样渗滤模块和用于给加样渗滤模块内部提供负压环境的抽滤模块;其中加样渗滤模块包括设置有样品通孔的微孔加样板,还设置有与样品通孔对应的渗滤通孔的支撑层,以及抽滤槽体;微孔加样板中设置有第一吸合单元,抽滤槽体中设置有与第一吸合单元相配合的第二吸合单元;通过配合的吸合单元吸附固定形成封闭的内腔;以及使杂交膜层和支撑层依次固定于微孔加样板下方。该装置携带方便,操作简单,能够有效防止样品间交叉污染的斑点杂交反应装置的问题。



1. 一种斑点杂交反应装置,其特征在于,包括加样渗滤模块和用于给加样渗滤模块内部提供负压环境的抽滤模块;

所述加样渗滤模块包括:微孔加样板、杂交膜层、支撑层和抽滤槽体;

所述微孔加样板上设置若干用于进行反应的样品通孔,所述支撑层设置与所述样品通孔对应的渗滤通孔;

所述微孔加样板中设置有第一吸合单元,所述抽滤槽体中设置有与第一吸合单元相配合的第二吸合单元;

所述微孔加样板和所述抽滤槽体通过第一吸合单元和第二吸合单元吸附固定后形成封闭的内腔;以及使所述杂交膜层和支撑层依次固定于微孔加样板下方,所述杂交膜层与所述微孔加样板的下表面紧密接触。

2. 根据权利要求1所述的斑点杂交反应装置,其特征在于,所述微孔加样板设置有用预留空间的边框凸缘,所述空间用于至少容纳杂交膜层和支撑层。

3. 根据权利要求1所述的斑点杂交反应装置,其特征在于,所述第一吸合单元和所述第二吸合单元分别独立的包括若干磁铁单元、若干电磁铁单元和若干与磁性物质相吸附的金属单元中的一种或几种;

优选地,所述第一吸合单元包括若干的内嵌于微孔加样板的边框凸缘内的磁铁单元,所述抽滤槽体的主体使用与磁性物质相吸附的金属制成;

优选地,所述磁铁单元中的磁铁主要由表面镀镍的磁铁制成;

优选地,所述与磁性物质相吸附的金属单元主要由马氏体不锈钢制成。

4. 根据权利要求1所述的斑点杂交反应装置,其特征在于,所述样品通孔呈行列式排布;

优选地,所述微孔加样板按照行列式分布有48个样品通孔;所述48个样品通孔优选按照8×6分布分布;

优选地,所述微孔加样板按照行列式分布有96个样品通孔;所述96个样品通孔优选按照8×12分布分布;

优选地,所述样品通孔的容积为100-1500 μ L;优选为500-1000 μ L;更优选为600-800 μ L。

5. 根据权利要求1所述的斑点杂交反应装置,其特征在于,所述支撑层上设置沿渗滤通孔圆周方向的环状凸缘,所述环状凸缘面向微孔加样板方向;

优选地,所述杂交膜层和支撑层之间还包括密封垫层,所述密封垫层上设置有与所述样品通孔对应的通孔;

优选地,所述杂交膜层和所述密封垫层之间还设置有至少一层滤纸层。

6. 根据权利要求1所述的斑点杂交反应装置,其特征在于,所述抽滤槽体内的凹槽的横截面积随着远离微孔加样板的方向减小;

优选地,所述抽滤槽体内的凹槽的纵截面呈V形、等腰梯形或半圆形;

优选地,所述抽滤槽体的侧壁上还设置有用和抽滤模块连通的抽滤孔。

7. 根据权利要求1所述的斑点杂交反应装置,其特征在于,所述斑点杂交反应装置还包括温控模块;

优选地,所述温控模块为恒温孵育槽,所述恒温孵育槽内嵌有薄膜加热模块和PID控温模块。

8. 根据权利要求1所述的斑点杂交反应装置,其特征在于,所述斑点杂交反应装置还包括成像模块;

优选地,所述成像模块包括照相机或凝胶成像仪。

9. 权利要求1-8中任一项所述的斑点杂交反应装置在分子杂交实验中的应用。

10. 一种使用权利要求1-8中任一项所述的斑点杂交反应装置进行的免疫印迹检测方法,其特征在于,包括将待测样品点样至所述样品通孔内,当待测样品与经标记物标记的抗体或抗原反应完毕后,启动抽滤模块将反应体系中的液相物质抽滤至抽滤槽体的凹槽内,反应体系中的固相物质滞留于杂交膜,显色后形成杂交斑点;

优选地,所述免疫印迹检测方法包括如下步骤:

(i) 提供杂交膜层经活化处理过的斑点杂交反应装置;

(ii) 在样品通孔中加入湿转缓冲液润湿杂交膜层,然后使用0.03-0.08Mpa的压力抽滤;点样后在20-25℃的条件下静置20-30min后用0.03-0.05Mpa压力抽滤5-10秒;

(iii) 在样品通孔中加入封闭缓冲液20-25℃孵育30-60min,清洗后在样品通孔中加入经标记物标记的抗体或抗原,在温度35-40℃的条件下室温反应40-60min;

(iv) 去除经标记物标记的抗体或抗原,清洗后使用显色试剂恒温孵育3-5min后,0.03-0.05Mpa抽滤10秒,调节至室温放置10min后,取出杂交膜层。

斑点杂交反应装置及其应用和免疫印迹检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及分子杂交实验装置技术领域,尤其是涉及一种斑点杂交反应装置及其应用和免疫印迹检测方法。

背景技术

[0002] 分子杂交技术是核酸和蛋白质等生物大分子常用的检测手段,核酸分子杂交是用标记的DNA或RNA为探针,以检测特定核酸序列的方法;蛋白质分子杂交是应用抗原与抗体特异性结合的原理,通过化学反应使标记抗体的显色剂来检测特定的多肽和蛋白,分子杂交具有很高的灵敏度和高度的特异性。

[0003] 斑点杂交是分子杂交技术中的一种方法,通常包含如下步骤:先将杂交膜预处理后将待测样品点样于杂交膜上,使样品中的靶分子吸附于杂交膜上,然后使用经标记物标记的分子,例如靶蛋白分子通常使用标记物标记的抗体或抗原,核酸分子通常使用标记物标记的探针,与杂交膜上的靶分子杂交,显色后在杂交膜上形成斑点。

[0004] 现有的斑点杂交技术操作费时费力,不易标准化,容易造成样品间交叉污染,而且不适用在实验室以外的临床现场进行操作,因此一种改进的斑点杂交反应装置是目前市场需要的。

[0005] 有鉴于此,特提出本发明。

发明内容

[0006] 本发明的第一目的在于提供一种斑点杂交反应装置,缓解了现有技术中存在的缺乏一种携带方便,操作简单,能够有效防止样品间交叉污染的斑点杂交反应装置的问题。

[0007] 本发明的第二目的在于提供一种上述斑点杂交反应装置在分子杂交实验中的应用,可广泛的应用于蛋白和核酸的分子杂交实验。

[0008] 本发明的第三目的在于提供一种使用上述斑点杂交反应装置进行的免疫印迹检测方法,该方法操作简单,检测过程用时短,对检测环境及设备条件要求较低,可以实现一体式反应器内流程式操作。

[0009] 为解决上述技术问题,本发明特采用如下技术方案:

[0010] 一种斑点杂交反应装置,包括加样渗滤模块和用于给加样渗滤模块内部提供负压环境的抽滤模块;

[0011] 所述加样渗滤模块包括:微孔加样板、杂交膜层、支撑层和抽滤槽体;

[0012] 所述微孔加样板上设置若干用于进行反应的样品通孔,所述支撑层设置与所述样品通孔对应的渗滤通孔;

[0013] 所述微孔加样板中设置有第一吸合单元,所述抽滤槽体中设置有与第一吸合单元相配合的第二吸合单元;

[0014] 所述微孔加样板和所述抽滤槽体通过第一吸合单元和第二吸合单元吸附固定后

形成封闭的内腔;以及使所述杂交膜层和支撑层依次固定于微孔加样板下方,所述杂交膜层与所述微孔加样板的下表面紧密接触。

[0015] 优选地,所述微孔加样板设置有用预留空间的边框凸缘,所述空间用于至少容纳杂交膜层和支撑层。

[0016] 优选地,所述第一吸合单元和所述第二吸合单元分别独立的包括若干磁铁单元、若干电磁铁单元和若干与磁性物质相吸附的金属单元中的一种或几种;

[0017] 优选地,所述第一吸合单元包括若干的内嵌于微孔加样板的边框凸缘内的磁铁单元,所述抽滤槽体的主体使用与磁性物质相吸附的金属制成;

[0018] 优选地,所述磁铁单元中的磁铁主要由表面镀镍的磁铁制成;

[0019] 优选地,所述与磁性物质相吸附的金属单元主要由马氏体不锈钢制成。

[0020] 优选地,所述样品通孔呈行列式排布;

[0021] 优选地,所述微孔加样板按照行列式分布有48个样品通孔;所述48个样品通孔优选按照8×6分布分布;

[0022] 优选地,所述微孔加样板按照行列式分布有96个样品通孔;所述96个样品通孔优选按照8×12分布分布;

[0023] 优选地,所述样品通孔的容积为100-1500μL;优选为500-1000μL;更优选为600-800μL。

[0024] 优选地,所述支撑层上设置沿渗滤通孔圆周方向的环状凸缘,所述环状凸缘面向微孔加样板方向;

[0025] 优选地,所述杂交膜层和支撑层之间还包括密封垫层,所述密封垫层上设置有与所述样品通孔对应的通孔;

[0026] 优选地,所述杂交膜层和所述密封垫层之间还设置有至少一层滤纸层。

[0027] 优选地,所述抽滤槽体内的凹槽的横截面积随着远离微孔加样板的方向减小;

[0028] 优选地,所述抽滤槽体内的凹槽的纵截面呈V形、等腰梯形或半圆形;

[0029] 优选地,所述抽滤槽体的侧壁上还设置有用和抽滤模块连通的抽滤孔。

[0030] 优选地,所述斑点杂交反应装置还包括温控模块;

[0031] 优选地,所述温控模块为恒温孵育槽,所述恒温孵育槽内嵌有薄膜加热模块和PID控温模块。

[0032] 优选地,所述斑点杂交反应装置还包括成像模块;

[0033] 优选地,所述成像模块包括照相机或凝胶成像仪。

[0034] 本发明还提供了上述斑点杂交反应装置在分子杂交实验中的应用。

[0035] 一种使用上述斑点杂交反应装置进行的免疫印迹检测方法,包括将待测样品点样至所述样品通孔内,当待测样品与经标记物标记的抗体或抗原反应完毕后,启动抽滤模块将反应体系中的液相物质抽滤至抽滤槽体的凹槽内,反应体系中的固相物质滞留于杂交膜,显色后形成杂交斑点;

[0036] 优选地,所述免疫印迹检测方法包括如下步骤:

[0037] (i) 提供杂交膜层经活化处理过的斑点杂交反应装置;

[0038] (ii) 在样品通孔中加入湿转缓冲液润湿杂交膜层,然后使用0.03-0.08Mpa的压力抽滤;点样后在20-25℃的条件下静置20-30min后用0.03-0.05Mpa压力抽滤5-10秒;

[0039] (iii) 在样品通孔中加入封闭缓冲液20-25℃孵育30-60min,清洗后在样品通孔中加入经标记物标记的抗体或抗原,在温度35-40℃的条件下室温反应40-60min;

[0040] (iv) 去除经标记物标记的抗体或抗原,清洗后使用显色试剂恒温孵育3-5min后,0.03-0.05Mpa抽滤10秒,调节至室温放置10min后,取出杂交膜层。

[0041] 与现有技术相比,本发明具有如下有益效果:

[0042] 本发明提供的斑点杂交反应装置在微孔加样板和抽滤槽体中设置配合的吸合单元,一方面使微孔加样板和抽滤槽体固定的更紧密,使微孔加样板和抽滤槽体之间形成的内部空间不容易漏液和漏气,保证了抽滤的效果,并且简化了组装过程,节省装配时间;另一方面还使微孔加样板的下表面、杂交膜层和支撑层之间更加紧密的贴付,使样品通孔中的样品不易从微孔加样板与杂交膜层的缝隙中泄露,避免了样品间的交叉污染,提升了检测的准确度。本发明提供的斑点杂交反应装置可以一体化的完成样品的反应并在杂交膜层上形成斑点,中间无需更换反应场所,实现了斑点杂交在一体化微型反应器上的标准化操作。且该装置体积小,抽滤系统可协助杂交斑点快速形成,便于实验人员快速检测的需要;并且该斑点杂交反应装置携带方便、操作简单、检测快速,可直接连接220V交流电源或车载电源进行检测,对检测环境及设备条件要求较低。

[0043] 本发明还提供了上述斑点杂交反应装置在分子杂交实验中的应用,可广泛的应用于蛋白和核酸的分子杂交实验中,上述斑点杂交反应装置携带方便、操作简单、检测快速,对检测环境及设备条件要求较低;可实现一体式反应器内流程式操作。

[0044] 本发明提供了一种使用上述斑点杂交反应装置进行的免疫印迹检测方法,该方法操作简便,检测成本低,此外可有效避免样品间交叉污染。

附图说明

[0045] 为了更清楚地说明本发明具体实施方式或现有技术中的技术方案,下面将对具体实施方式或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图是本发明的一些实施方式,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据这些附图获得其他的附图。

[0046] 图1为本发明实施例1提供的微孔加样板的俯视图;

[0047] 图2为本发明实施例1提供的加样渗滤模块的截面示意图;

[0048] 图3为本发明实施例1提供的斑点杂交反应装置的工作示意图;

[0049] 图4为使用本发明实施例1提供的斑点杂交反应装置检测猪瘟病毒E2重组蛋白形成的杂交斑点;

[0050] 图5为本发明实施例2检测猪瘟病毒E2重组蛋白得到的标准曲线;

[0051] 图6为使用蛋白电泳定量法检测猪瘟病毒E2重组蛋白的检测结果;

[0052] 图7为使用蛋白电泳定量法检测猪瘟病毒E2重组蛋白得到的标准曲线;

[0053] 图8为使用双抗夹心elisa定量法检测猪瘟病毒E2重组蛋白得到的标准曲线。

具体实施方式

[0054] 下面将结合附图对本发明的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通

技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。实施例中未注明具体条件者,按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者,均为可以通过市售购买获得的常规产品。

[0055] 在本发明的描述中,需要说明的是,如出现术语“中心”、“上”、“下”、“左”、“右”、“竖直”、“水平”、“内”、“外”等,其所指示的方位或位置关系为基于附图所示的方位或位置关系,仅是为了便于描述本发明和简化描述,而不是指示或暗示所指的装置或元件必须具有特定的方位、以特定的方位构造和操作,因此不能理解为对本发明的限制。此外,如出现术语“第一”、“第二”、“第三”仅用于描述目的,而不能理解为指示或暗示相对重要性。

[0056] 在本发明的描述中,需要说明的是,除非另有明确的规定和限定,如出现术语“安装”、“相连”、“连接”应做广义理解,例如,可以是固定连接,也可以是可拆卸连接,或一体地连接;可以是机械连接,也可以是电连接;可以是直接相连,也可以通过中间媒介间接相连,可以是两个元件内部的连通。对于本领域的普通技术人员而言,可以根据具体情况理解上述术语在本发明中的具体含义。

[0057] 本发明提供了一种斑点杂交反应装置,该装置包括加样渗滤模块,加样渗滤模块主要由微孔加样板、杂交膜层、支撑层和抽滤槽体组成。

[0058] 所述微孔加样板上设置若干用于进行反应的样品通孔,所述支撑层设置有所述样品通孔对应的渗滤通孔,以使样品抽滤时样品中的液体部分可以顺利通过杂交膜流出。

[0059] 所述微孔加样板中设置有第一吸合单元,所述抽滤槽体中设置有与第一吸合单元相配合的第二吸合单元。相互配合的第一吸合单元和第二吸合单元的作用一方面是使微孔加样板和抽滤槽体的接触面通过吸附作用紧密接触,固定后形成封闭的内腔。使用吸合单元固定微孔加样板和抽滤槽体,可使微孔加样板和抽滤槽体的接触面紧密相贴,不留缝隙,避免使用抽滤装置为所述封闭的内腔提供负压环境时漏气漏液。另一方面的作用是使所述杂交膜层和支撑层依次固定于微孔加样板下方,并且使杂交膜层与所述微孔加样板的下表面紧密接触,使杂交膜层作为样品通孔的底部,以用于盛放样品、试剂或反应体系,并避免液体流出。通过第一吸合单元和第二吸合单元的吸附固定可以将微孔加样板、杂交膜层、支撑层和抽滤槽体有效并且紧密的集成成为一个整体。

[0060] 本发明提供的斑点杂交反应装置还包括用于给加样渗滤模块内部提供负压环境的抽滤模块。当加样渗滤模块内部为负压时,微孔加样板的下表面的压强将低于上表面的压强,其上下表面之间形成压强差,该压强差为样品通孔中的液相物质提供了一个流动的力,使液相物质从样品通孔中通过杂交膜层流入抽滤槽体的凹槽内,而样品通孔中的固相物质则滞留在杂交膜层上。

[0061] 使用时,将微孔加样板、经过预处理的杂交膜层和支撑层依次层叠放置、然后将微孔加样板和抽滤槽体吸附紧密,使微孔加样板、杂交膜层、支撑层和抽滤槽体紧密的集成成为一个整体,即为加样渗滤模块。杂交膜层在支撑层挤压的作用下紧密的贴敷于微孔加样板的下表面。然后将待测样品或检测用试剂加入至样品通孔中,在需要渗滤时使用抽滤模块为加样渗滤模块内部提供负压,在负压吸力的作用下,样品通孔中的液相物质通过杂交膜和支撑层上的渗滤通孔流至抽滤槽体的凹槽内;同时样品通孔内的固相物质则留在杂交膜上形成“斑点”。

[0062] 本发明提供的斑点杂交反应装置在微孔加样板和抽滤槽体中设置配合的吸合单

元,一方面使微孔加样板和抽滤槽体固定的更紧密,使微孔加样板和抽滤槽体之间形成的内部空间不容易漏液和漏气,保证了抽滤的效果,并且简化了组装过程,节省装配时间;另一方面还使微孔加样板的下表面、杂交膜层和支撑层之间更加紧密的贴付,使样品通孔中的样品不易从微孔加样板与杂交膜层的缝隙中泄露,避免了样品间的交叉污染,提升了检测的准确度。本发明提供的斑点杂交反应装置可以一体化的完成样品的反应并在杂交膜层上形成斑点,中间无需更换反应场所,实现了斑点杂交在一体化微型反应器上的标准化操作。且该装置体积小,抽滤系统可协助杂交斑点快速形成,便于实验人员快速检测的需要;并且该斑点杂交反应装置携带方便、操作简单、检测快速,可直接连接220V交流电源或车载电源进行检测,对检测环境及设备条件要求较低。需要说明的是,本发明提供的斑点杂交反应装置适用于例如可以为但不限于为蛋白样品、DNA样品或RNA样品,本发明不限制样品类型。

[0063] 在一些优选的实施方式中,微孔加样板和支撑层分别独立的由耐高温、高压、透明或半透明塑料制成,所述塑料例如可以为但不限于为聚丙烯、聚碳酸酯材料。在一些可选的实施方式中,根据生化反应的种类选择杂交膜层的材质,所述杂交膜层例如可以为但不限于为硝酸纤维素膜、醋酸纤维素膜、聚偏氟乙烯膜或尼龙膜。

[0064] 在一些优选的实施方式中,所述微孔加样板的边框高于微孔加样板上分布有样品通孔的区域表面,以形成边框凸缘。可选地,所述边框凸缘在面向抽滤槽体的方向上高于微孔加样板上分布有样品通孔的区域表面时,所述边框凸缘用于预留至少容纳杂交膜层和支撑层的空间;可选地,当所述边框凸缘在背向抽滤槽体的方向上高于微孔加样板上分布有样品通孔的区域时,可以防止点样时溢出的样品从微孔加样板的侧壁流出。

[0065] 在一些可选的实施方式中,所述第一吸合单元和所述第二吸合单元分别独立的包括若干磁铁单元、若干电磁铁单元和若干与磁性物质相吸附的金属单元中的一种或几种。例如可以为但不限于为如下配合方式:所述第一吸合单元包括若干磁铁单元,所述第二吸合单元包括若干磁铁单元,第一吸合单元内的磁铁单元和第二吸合单元内的磁铁单元磁性相反;所述第一吸合单元包括若干磁铁单元,所述第二吸合单元包括若干与磁性物质相吸附的金属单元;所述第一吸合单元包括若干与磁性物质相吸附的金属单元,所述第二吸合单元包括若干磁铁单元;所述第一吸合单元包括若干电磁铁单元,所述第二吸合单元包括若干与磁性物质相吸附的金属单元;所述第一吸合单元包括若干与磁性物质相吸附的金属单元,所述第二吸合单元包括若干电磁铁单元。可以理解的是,本发明第一吸合单元和第二吸合单元的组合方式并不限于上述几种组合方式,只要可以起到将微孔反应板和抽滤槽体紧密吸附的作用即可。

[0066] 在一些优选的实施方式中,所述第一吸合单元内嵌于微孔加样板的边框凸缘内,所述第二吸合单元设置于微孔加样板的边框凸缘与抽滤槽体相接触的表面。在一些更优选的实施方式中,所述第一吸合单元包括若干的内嵌于微孔加样板的边框凸缘内的磁铁单元,该磁铁单元主要由表面镀镍的磁铁制成;所述抽滤槽体的主体使用与磁性物质相吸附的金属制成,优选使用马氏体不锈钢制成,即以抽滤槽体的整体作为第二吸合单元,使用时微孔加样板通过边框凸缘直接吸附固定于抽滤槽体上,以使固定更加牢固,不留缝隙。其中,使用马氏不锈钢作为抽滤槽体的主体,利于导热,可与微孔加样板内嵌的磁铁单元紧密吸附,从而组装、固定加样渗滤模块,高效密封防止样品口间交叉污染。

[0067] 在一些可选的实施方式中,所述微孔加样板上的样品通孔均匀分布,例如可以为但不限于为按照行列式分布或者按照周向分布;所述样品通孔 优选呈行列式排布,规则排布方便样品形成斑点后标记和比较,例如可以 使样品依浓度递增或递减排列,以便制作标准曲线,也便于样品与对照样 品成对分布。在一些优选的实施方式中,所述微孔加样板设置有48个样品 通孔或96个样品通孔,以增加样品检测的通量;其中设置有48个样品通 孔的加样板上的样品通孔优选呈8×6分布;设置有96个样品通孔的加样 板上的样品通孔优选呈8×12分布,上述分布方式可以兼容多道移液器成 排的快速点样。在一些优选的实施方式中,所述样品通孔的横截面为圆形、规则多边形以及不规则多边形的至少一种。在一些优选的实施方式中,所 述样品通孔的容积为100–1500μL,例如可以为但不限于为100μL、200μL、500μL、600μL、800μL、1000μL、1200μL或1500μL,优选为500–100μL;更优选为600–800μL;可以根据斑点杂交反应装置的适用场景进一步调整和 优化样品通孔的容积,样品通孔的容积更小,微孔加样板上可以容纳更多 的样品通孔,以增加检测的通量;增加样品通孔的容积可以提高点样时点 入的待测样品的量。当所述样品通孔的容积可以至少容纳600μL的液相物 质时,能进一步保证待测样品中含有充足的可以通过渗滤作用固定于杂交膜层上的固相物质,以提高检测灵敏度,便于检出低浓度样品和斑点印迹 扫描。

[0068] 在一些可选的实施方式中,所述支撑层上设置沿渗滤通孔圆周方向的 环状凸缘,所述环状凸缘面向微孔加样板方向,当微孔加样板和抽滤槽体 闭合后,该环状凸缘可以将杂交膜层紧密的挤压于微孔加样板的下表面,防止液体渗漏导致的加样孔间交叉污染,或者在杂交膜层形成的斑点边界 不清导致的妨碍样品精准定量,从而进一步的保证了高品质的印迹结果。为了进一步的防止样品通孔中的液体渗漏,在一些可选的实施方式中,所述杂交膜层和支撑层之间还包括密封垫层,所述密封垫层上设置有与所述 若干样品通孔对应的通孔,密封垫层优选使用硅橡胶、氟橡胶或聚四氟乙 烯制成;在一些可选的实施方式中,在所述杂交膜层和所述密封垫层之间 还设置有至少一层滤纸层。

[0069] 在一些可选的实施方式中,所述抽滤槽体内凹槽的横截面积随着远离 微孔加样板的方向减小,以使经抽滤流出的液相物质汇集在滤槽体内凹槽 的底部,方便收集滤液。所述抽滤槽体内凹槽的纵截面例如可以为但不限 于为V形、等腰梯形或半圆形。

[0070] 在一些优选的实施方式中,所述抽滤模块中主要起到抽滤作用的抽滤 装置例如可以为但不限于为真空泵、抽滤泵或注射器,优选手提式无油真 空泵、实验室抽滤泵,兽医临床中也可选择使用一次性注射器进行抽滤操 作。优选地,所述抽滤槽体的侧壁还设置有用于和抽滤装置连通的抽滤孔, 可在抽滤孔中插入管路与抽滤装置相连。

[0071] 在一些可选的实施方式中,所述斑点杂交反应装置还包括为生化反应 提供可控的恒温环境的温控模块。可选地,所述控温模块可以为内嵌于 抽滤槽体和/或微孔反应板内的电加热器;可选地,也可以选择外置的加热 模块。优选地,所述外置加热模块为恒温孵育槽,所述恒温孵育槽内设置 加热模块和用于控制加热模块的调控模块;所述恒温孵育槽还设置有用 于放置加样渗滤模块的凹槽。所述加热模块优选使用薄膜加热模块,所述 调控模块优选使用PID控温模块,薄膜加热模块体积小,以其作为发热元件 的微孔板恒温孵育器体积小、发热效率高,方便使用和携带;PID控温模块 为使用PID模糊控制技术调控温度的模块,PID模糊控制技术能够精准地 确保控温精度,并自动调整加热速率、节省等待时间。

[0072] 在一些可选的实施方式中,所述斑点杂交反应装置还包括成像模块,以定性或者定量的记录杂交膜层上的斑点。优选地,所述成像模块包括图像获取模块和图像分析模块。所述图像获取模块用于记录杂交膜上的斑点,所述图像分析模块用于辅助相关图形、图像处理软件读取斑点灰光度值,进行定性或定量分析;所述成像模块例如可以为但不限于为照相机或凝胶成像仪,优选使用可定量分析的凝胶成像仪。

[0073] 本发明还提供了上述斑点杂交反应装置在分子杂交实验中的应用,该应用和上述斑点杂交反应装置基于相同的发明构思,因此具有上述斑点杂交反应装置的所有有益效果,在此不再赘述。需要说明的是,本发明所述的在分子杂交实验中的应用仅指的是应用分子杂交技术检测出待测样品中是否含有目标物质,并非用于疾病的诊断和治疗。

[0074] 本发明提供的上述斑点杂交反应装置在分子杂交实验中的应用,可应用于蛋白样品的检测,例如对兽医临床中畜禽血样的抗原、抗体测定,也能对兽用疫苗研发、生产过程中有效抗原进行快速、准确地定性及定量,能够同时检测多种抗体、抗原,实现了现场实时评估疫苗抗原含量,检测时间只需90-120min;还可应用于核酸样品的检测,例如对兽医临床中畜禽血液样本、组织样本以及细胞样本中的DNA和/或RNA的检测;使用本发明提供的斑点杂交反应装置进行分子杂交实验,操作简便,检测成本低,此外可有效避免样品间交叉污染。上述对兽医临床中畜禽血液样本、组织样本以及细胞样本中的DNA和/或RNA的检测的目的仅为检测是否含有目标分子,并不意味着检测结果能够直接用于疾病的诊断和治疗。

[0075] 本发明还提供了上述斑点杂交反应装置进行的免疫印迹检测方法,该方法采用一体式反应器内流程式操作,操作简便,该方法包括如下步骤:将待测样品点样至所述样品通孔内,当待测样品与经标记物标记的抗体或抗原反应完毕后,启动抽滤模块将反应体系中的液相物质抽滤至抽滤槽体的凹槽内,反应体系中的固相物质滞留于杂交膜,显色后形成杂交斑点。

[0076] 按照如下方式实施免疫印迹检测方法,效果更佳:

[0077] (i) 杂交膜准备及预处理:将杂交膜层剪裁为与微孔反应板下表面配合的尺寸,用甲醇活化10s,浸泡在湿转缓冲液内,另准备同样大小的薄滤纸垫在密封垫层下方,以防渗漏。然后将加样渗滤模块各组件组合,保证杂交膜层与微孔反应板下表面贴合紧密,注意避免膜间产生气泡,通过微孔加样板中的第一吸合单元和抽滤槽体中的第二吸合单元完成加样渗滤模块的组装及固定,用管路连接加样渗滤模块和抽滤模块。

[0078] (ii) 膜水化及点样:在样品通孔中加入湿转缓冲液以润湿杂交膜层,启动抽滤模块,用0.03-0.08Mpa的压力抽滤,当可见液体由孔底流出时,迅速关闭抽滤模块;将待测样品加入样品通孔中并记录加样顺序,加样体积优选100-600 μ L/孔,反应温度20-25 $^{\circ}$ C,静置20-30min,使液体在重力作用下自动流出,之后用0.03-0.05Mpa压力抽滤5-10秒;有微孔板离心设备的可选择在3000-4000rpm条件下,离心5min完成快速上样。

[0079] (iii) 封闭、孵育反应:每孔加入封闭试剂在20-25 $^{\circ}$ C孵育30-60min;用PBST清洗3-5次,100-3000 μ L/孔;每孔加入100-200 μ L标记物标记的抗体或抗原,标记物优选辣根过氧化物酶或胶体金,调节恒温孵育器至37 $^{\circ}$ C,室温反应40-60min。

[0080] (iv) 显影及成像:将标记物标记的抗体或抗原吸出后,用PBST清洗清洗3-5次,100-300 μ L/孔。加入显影液进行显影,优选ECL化学发光剂、DAB等,恒温孵育3-5min后,

0.03-0.05Mpa抽滤10秒,调节至室温放置 10min后,拆开加样渗滤模块,取出杂交膜层,使用凝胶成像系统拍照、采集信号,分析数据。

[0081] 下面结合优选实施例进一步说明本发明的有益效果。

[0082] 实施例1

[0083] 本实施例提供了一种斑点杂交反应装置,参考图1、图2和图3所示。本实施例提供的斑点杂交反应装置包括加样渗滤模块100,加样渗滤模块 100包括:微孔加样板110,微孔加样板上设置有样品通孔111和边框凸缘 112,加样渗滤模块100还包括杂交膜层120、滤纸层130、密封垫层140 和支撑层150,支撑层150上设置环状凸缘151;加样渗滤模块100还包括 抽滤槽体160,抽滤槽体160上设置有凹槽161,抽滤槽体160侧壁上设置 有抽滤孔162;

[0084] 本实施例提供的斑点杂交反应装置还包括抽滤模块:包括无油真空泵 210、压力表220和抽滤管路230,抽滤管路230上设置抽滤开关231;

[0085] 本实施例提供的斑点杂交反应装置还包括恒温孵育槽300:恒温孵育槽 300侧壁设置液晶控制面板310。

[0086] 微孔加样板110上设置有按照8×12型行列式分布的样品通孔111,样 品通孔111的横截面积为圆形,样品通孔111的容积为600μL;微孔加样板 110的边框凸缘112面向抽滤槽体160的凸起到部分起到限位作用,以预留 容纳杂交膜层120、滤纸层130、密封垫层140和支撑层150的空间,背向 抽滤槽体160的凸起的部分起到防止液体从微孔加样板110溢出。

[0087] 微孔加样板110的边框凸缘112高为1.5cm,样品通孔111的高度为 0.5cm,微孔加样板110的其余部分的尺寸如表1所示,尺寸标记标于图1, 其中A为微孔加样板110的宽度;B为第1行的样品通孔111的圆心至第8 行的同列的样品通孔111的圆心的距离;C为微孔加样板110的长度;D为 第1列的样品通孔111的圆心至第12列的同行的样品通孔111的圆心的 距 离;E为相邻的两行或两列的样品通孔111的圆心的距离;F为样品通孔111 的直径。

[0088] 表1微孔加样板110的尺寸参数

[0089]

单位:mm	A	B	C	D	E	F	G
96孔板	85.5	63	126	99	9	8	5

[0090] 第一吸合单元为镀镍的强力磁铁,内嵌于边框凸缘112的壳体内,并 充满整个边框凸缘112,使磁铁围绕微孔加样板110中分布有样品通孔111 的区域从而成回形;第二吸合单元为使用马氏体不锈钢制成的抽滤槽体160 本身。微孔加样板110和抽滤槽体160吸附固定后杂交膜层120、滤纸层 130、密封垫层140和支撑层150依次层叠于微孔加样板110的 下方,杂交 膜层120紧密贴付于微孔加样板110的下表面,使杂交膜层120作为样品 通孔111的底部,以用于盛放样品、试剂或反应体系;杂交膜层120下设置有一层滤纸层130,滤纸层130下为密封垫层140,密封垫层140上设置 有与样品通孔111对应的通孔;密封垫层140下为支撑层150,支撑层150 上设置有与样品通孔111对应的渗滤通孔并且沿渗滤通孔 圆周方向的环状 凸缘151,环状凸缘151面向微孔反应板的方向凸起,以进一步加强对杂交膜层120的挤压效果,使杂交膜层120紧密的止抵与微孔加样板110下表面。本实施例的微孔加样板110的外壳和支撑层150使用聚丙烯制成;杂 交膜层120使用聚偏二氟乙烯膜(PVDF膜);密封垫层140使用硅橡胶制 成。

[0091] 抽滤槽体160内的凹槽161的纵截面呈V形,如图2所示,在抽滤槽体的侧壁上设置有一个抽滤孔162,抽滤孔162中可插入抽滤管路230以与无油真空泵210连接,抽滤管路230上设置有抽滤开关231,无油真空泵210上还设置有用于监控压力的压力表220,本实施例使用的抽滤管路230为硅胶管。

[0092] 本实施例的恒温孵育槽300上的凹槽与加样渗滤模块100相吻合,该恒温孵育槽300以薄膜加热模块作为加热元件,并通过PID控温模块控制温度,在恒温孵育槽300的侧壁上还设置有液晶控制面板310,以调节、显示反应温度及时间。

[0093] 使用时,按照抽滤槽体160-支撑层150-密封垫层140-滤纸层130-杂交膜层120-微孔加样板110的顺序由下而上的安装,抽滤槽体160和微孔加样板110吸附固定后使上述各部件集合成为一个整体,即为加样渗滤模块100。杂交膜层120在支撑层150挤压的作用下紧密的贴敷于微孔加样板110的下表面。然后加样渗滤模块100置于恒温孵育槽300中,用抽滤管路230连接加样渗滤模块100和无油真空泵210。然后将待测样品或检测用试剂加入至样品通孔111中,调节恒温孵育槽300至需要的反应温度,在需要渗滤时开启无油真空泵210为加样渗滤模块100内部提供负压,在负压吸力的作用下,样品通孔111中的液相物质依次通过杂交膜、密封垫层140上的通孔和支撑层150上的渗滤通孔流至抽滤槽体160的凹槽161内;同时样品通孔111内的固相物质滞留在杂交膜上,显色后形成“斑点”。取出杂交膜层120后使用凝胶成像系统拍照、采集信号并分析数据。

[0094] 实施例2

[0095] 本实施例使用实施例1提供的斑点杂交反应装置进行猪瘟病毒E2蛋白重组杆状病毒灭活疫苗生产过程中E2重组蛋白含量测定。步骤如下:

[0096] (i) 杂交膜层120准备及预处理:取裁剪好的10.5cm×7.5cm PVDF膜作为杂交膜层120,用甲醇活化10s,浸泡在湿转缓冲液内,另准备同样大小的薄滤纸垫在密封垫层140下方,以防渗漏。

[0097] (ii) 组装加样渗滤模块100:按照抽滤槽体160-支撑层150-密封垫层140-滤纸层130-杂交膜层120-微孔加样板110的顺序由下而上的安装,固定各组件后置于恒温孵育槽300中,使用硅胶管连接无油真空泵210。

[0098] (iii) 膜水化及点样:在微孔加样板110的样品通孔111中加入200μL 湿转缓冲液以润湿PVDF膜,用无油真空泵210以0.05Mpa的压力抽滤,当液体由样品通孔111中流出时,迅速关闭无油真空泵210;用移液枪将待测E2重组蛋白及标准品(2倍梯度稀释的重组E2蛋白,浓度依次为250、125、62.5、31.25、15.625μg/ml)依次加入样品通孔111中,并设重复对照,200μL/孔,调节恒温孵育槽300至25℃,静置30min,使液体在重力作用下自动流出,之后用0.03-0.05Mpa压力抽滤5秒。

[0099] (iv) 封闭、孵育反应:每孔加入200μL含5%脱脂奶粉的PBST缓冲液,25℃孵育30min;用PBST清洗3次,200μL/孔;每孔加入100μL辣根过氧化物酶标记的抗体,调节恒温孵育槽300至37℃,反应60min。

[0100] (v) 步骤五、显影及成像:用移液枪将酶标抗体吸出后,用PBST清洗清洗3次,200微升/孔。加入ECL化学发光剂进行显影,恒温孵育3min后,0.03Mpa抽滤10秒,调节至室温放置10min后,拆开加样渗滤模块100,取出PVDF膜,用UV凝胶成像系统拍照、采集信号,分析数据,包括构建标准曲线,计算待测E2重组蛋白浓度。

[0101] 杂交膜层120上的杂交斑点如图4所示;标准曲线如图5所示,其中 $y=0.0006x-18.6798$; $R^2=0.9971$ 。

[0102] 效果例

[0103] 分别将实施例2检测的样品及标准品用蛋白电泳灰光度值定量法及双抗夹心 elisa法进行定量,比较三种定量方法的准确度。蛋白电泳定量法结果如图6所示,标准曲线如图7所示,其中 $y=45.594x-2.6827$; $R^2=0.998$ 。双抗夹心 elisa定量法构建标准曲线如图8所示,其中, $y=0.0003x-3.4359$; $R^2=0.9985$ 。三种方法的比较结果如表2所示:

[0104] 表2实施例2提供的检测方法、蛋白电泳灰光度值定量法和双抗夹心 elisa法的重组E2蛋白定量检测结果比较

[0105]

定量方法	蛋白电泳法 ($\mu\text{g/ml}$)		双抗夹心 elisa 法 ($\mu\text{g/ml}$)		斑点杂交法 ($\mu\text{g/ml}$)	
样品名称	条带灰光度	样品浓度	OD 值	样品浓度	斑点光密度	样品浓度
标准品 1	434527	250	-	-	869631	250
标准品 2	236785	125	2.77	125	452399	125
标准品 3	142376	62.5	1.50	62.5	245647	62.5
标准品 4	71722	31.25	0.73	31.25	117553	31.25
标准品 5	-	-	0.37	15.625	51095	15.625
待测品 1	103680	44.45	1.16	50.16	169665	47.33
待测品 2	105300	45.14	1.17	50.38	171876	47.96
待测品 3	97170	41.71	1.09	46.96	161911	45.12
待测品 4	94646	40.75	1.07	46.37	159174	44.34
R2	0.9971		0.9989		0.9985	
检测范围	10-250 $\mu\text{g/ml}$		0.1-125 $\mu\text{g/ml}$		0.5-250 $\mu\text{g/ml}$	
检测数量	5		90		90	

[0106]

操作复杂度	复杂	简单	简单
检测成本	15 元/样	30 元/样	5 元/样
检测时间	36h	4h	1.5-2h

[0107] 以上结果表明,三种方法获得的重组E2蛋白定量结果间差异不显著,构建的标准曲线拟合度均不低于0.99,重复样间测定结果偏差小于5%。检测准确度方面,双抗夹心

elisa法的检测灵敏度及准确性最高,斑点杂交法 次之,蛋白电泳法其次;检测成本方面 elisa最高,斑点杂交最低;检测方法难易程度及检测时间方面,斑点杂交最简单,检测周期最短,而且与elisa 一样,可实现高通量检测。

[0108] 最后应说明的是:以上各实施例仅用以说明本发明的技术方案,而非 对其限制;尽管参照前述各实施例对本发明进行了详细的说明,本领域的 普通技术人员应当理解:其依然可以对前述各实施例所记载的技术方案进 行修改,或者对其中部分或者全部技术特征进行等同替换;而这些修改或 者替换,并不使相应技术方案的本质脱离本发明各实施例技术方案的范围。

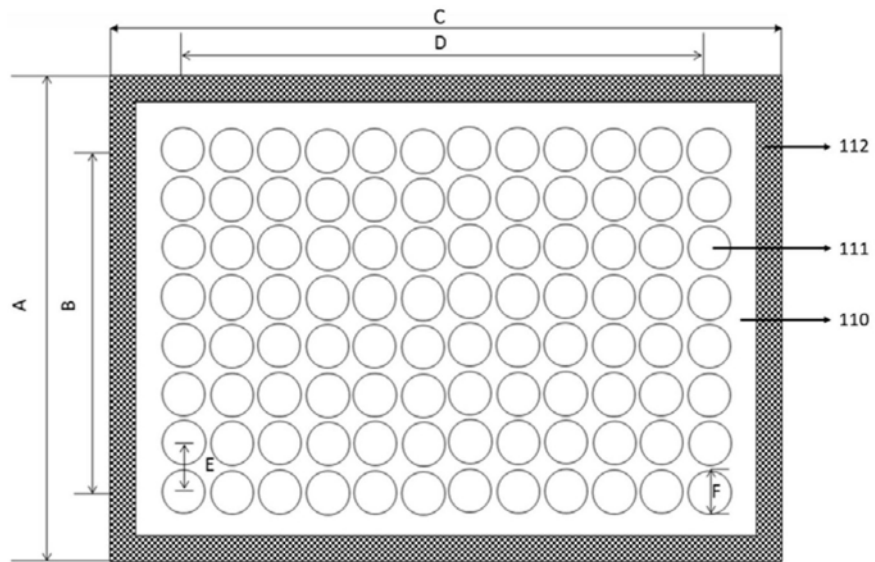


图1

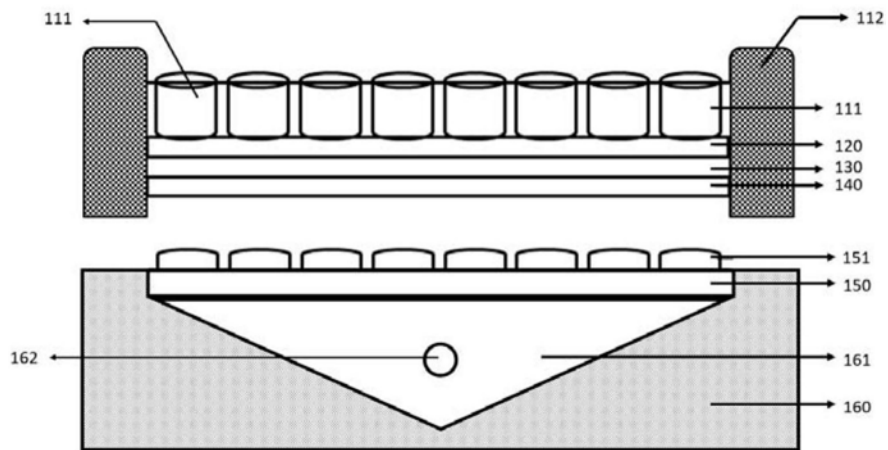


图2

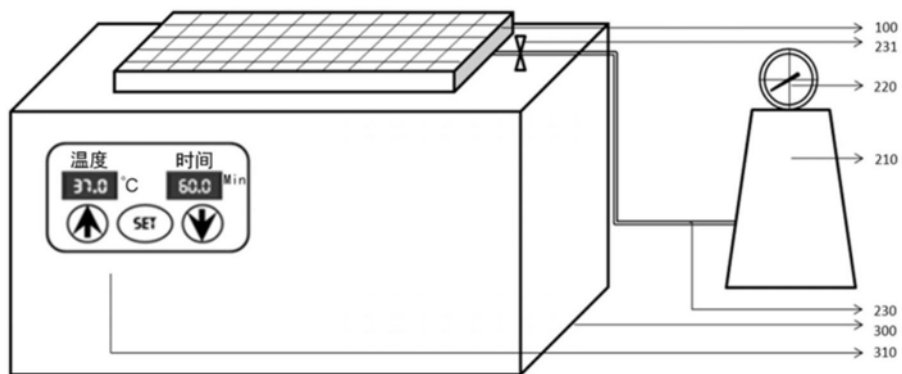


图3

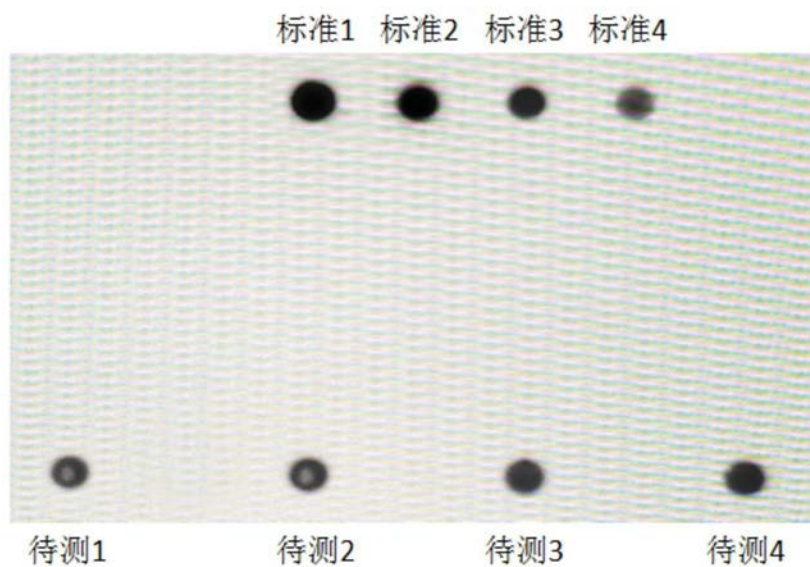


图4

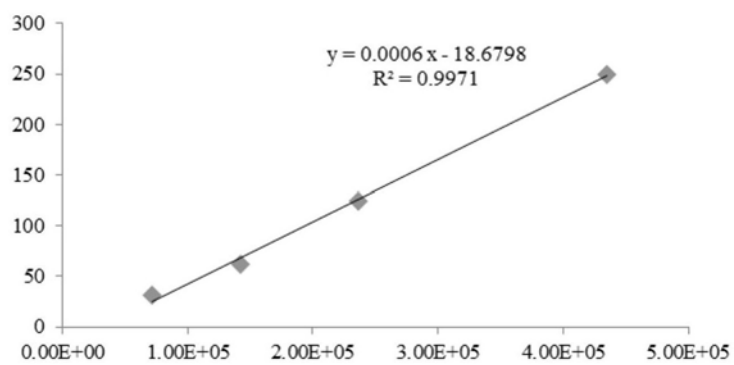


图5

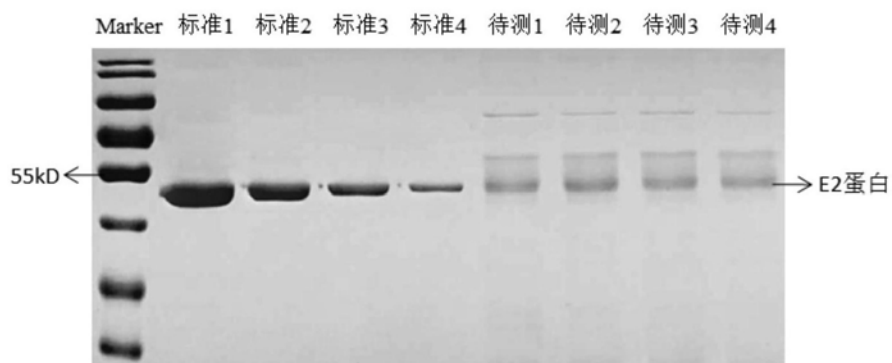


图6

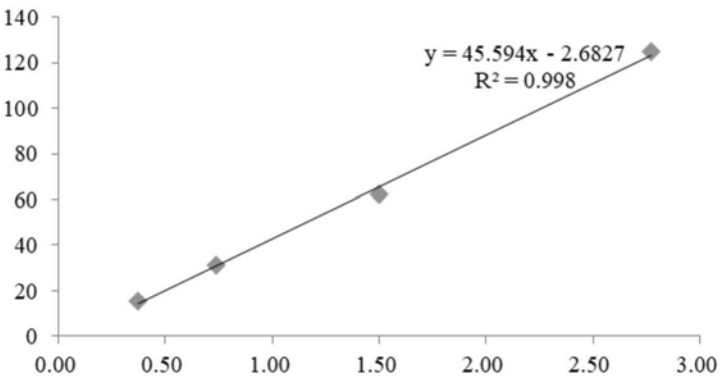


图7

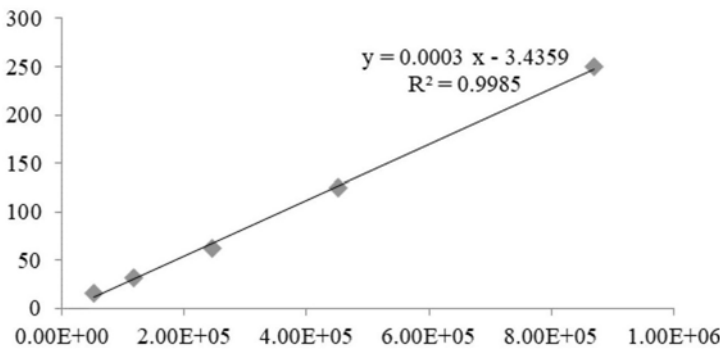


图8

专利名称(译)	斑点杂交反应装置及其应用和免疫印迹检测方法		
公开(公告)号	CN109439517A	公开(公告)日	2019-03-08
申请号	CN201811604174.3	申请日	2018-12-26
[标]申请(专利权)人(译)	天康生物股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	天康生物股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	天康生物股份有限公司		
[标]发明人	贺笋 王遵宝 徐龙飞 潘晓梅 李俊辉 李延涛 候玉珍 田晓艳		
发明人	贺笋 王遵宝 徐龙飞 潘晓梅 李俊辉 李延涛 候玉珍 田晓艳		
IPC分类号	C12M1/00 C12M1/38 C12Q1/6834 G01N33/53		
CPC分类号	C12Q1/6834 G01N33/5304 C12Q2565/631		
代理人(译)	李丙林		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种斑点杂交反应装置及其应用和免疫印迹检测方法，涉及分子杂交实验装置技术领域。该斑点杂交反应装置包括加样渗滤模块和用于给加样渗滤模块内部提供负压环境的抽滤模块；其中加样渗滤模块包括设置有样品通孔的微孔加样板，还设置有与样品通孔对应的渗滤通孔的支撑层，以及抽滤槽体；微孔加样板中设置有第一吸合单元，抽滤槽体中设置有与第一吸合单元相配合的第二吸合单元；通过配合的吸合单元吸附固定形成封闭的内腔；以及使杂交膜层和支撑层依次固定于微孔加样板下方。该装置携带方便，操作简单，能够有效防止样品间交叉污染的斑点杂交反应装置的问题。

