



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1979163 B

(45) 授权公告日 2012.06.27

(21) 申请号 200610064775.0

(22) 申请日 2006.11.03

(30) 优先权数据

60/732,994 2005.11.03 US

60/795,452 2006.04.27 US

(73) 专利权人 EMD 密理博公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 马渊雅治 木村广子

马克·埃梅里克 菲利普·克拉克

库尔特·格里尼兹恩

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

72002

代理人 过晓东

(51) Int. Cl.

G01N 33/53 (2006.01)

(56) 对比文件

US 4427415 A, 1984.01.24, 说明书第3栏第1行到第30行, 第5栏第40行到第57行, 附图7、

8.

US 5141719 A, 1992.08.25, 说明书第5栏第32到50行, 附图1.

CN 1645140 A, 2005.07.27, 全文.

EP 1151794 A2, 2001.11.07, 全文.

US 2004245163 A1, 2004.12.09, 全文.

WO 2004013607 A3, 2004.04.08, 全文.

审查员 杨冀川

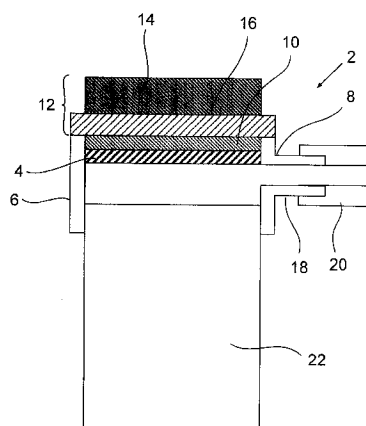
权利要求书 2 页 说明书 8 页 附图 8 页

(54) 发明名称

用于免疫印迹的测定装置及方法

(57) 摘要

本发明提供一种快速、有效、方便地检测位于印迹膜上的一种或多种生物实体的方法。本发明的方法涉及压力辅助的方法以提供和除去试剂, 并允许用极少体积的液体将污染物从膜上的待测物质中洗去。在另一方面, 本发明提供一种用于实施本发明方法的装置, 其包括若干层, 包括位于印迹膜下方的多孔支撑物, 位于印迹膜上方的流动分配器, 以及位于流动分配器上使液体至所希望区域的孔, 并允许使用较少起始体积的所述液体。优选地, 所述流动分配器为非结合或低结合的亲水多孔膜, 例如 0.22 微米的膜。



1. 一种进行免疫测定的装置,包括用于支撑一层或多层印迹膜的多孔支撑物(4),以及位于所述多孔支撑物顶部上的多孔流动分配器,该多孔流动分配器是亲水的并且具有低蛋白结合特性,以在其整个面上均匀地分配液体,该装置的特征在于位于所述流动分配器顶部上的一个或多个试剂孔(14)。

2. 如权利要求1所述的装置,

i) 其中所述流动分配器与所述一个或多个试剂孔为一体单元;或者

ii) 其中所述流动分配器是一膜,并且该流动分配器与一个或多个试剂孔为一体单元;或者

iii) 进一步包括夹持器及位于该夹持器下方用于回收试剂的收集盘;或者

iv) 进一步包括夹持器及位于该夹持器下方用于回收试剂的收集盘,并且其中该盘分为两个或更多个独立的小盘。

3. 如权利要求1所述的装置,其是用于真空辅助免疫测定,该装置进一步包括真空歧管(8)。

4. 如权利要求1所述的装置,其是用于真空辅助免疫测定,并进一步包括含有一种或多种待测定的生物实体的一个或多个膜(10),该一个或多个膜位于所述多孔支撑物的顶部上,所述流动分配器在该一个或多个膜的顶部上。

5. 如权利要求1所述的装置,其是用于真空辅助免疫测定,并进一步包括收集歧管(22),含有一种或多种待测定的生物实体的一个或多个膜(10),该一个或多个膜位于所述多孔支撑物的顶部上,所述流动分配器在该一个或多个膜的顶部上,以及可拆卸地密封在所述一个或多个试剂孔顶部上的压力盖,所述盖具有通向其内部的进口(15),所述进口与正气压源连接。

6. 如权利要求1所述的装置,其包括多个所述试剂孔,其中每个孔有其自己的流动分配器。

7. 一种进行真空辅助免疫测定的方法,包括以下步骤:

a. 提供一真空歧管(8),位于该真空歧管上的多孔支撑物(4),位于所述多孔支撑物上含有一种或多种待测生物实体的一个或多个膜(10),位于所述一个或多个膜顶部上的多孔流动分配器(12),以及位于所述流动分配器顶部上的一个或多个孔(14),其中所述流动分配器是亲水的并且具有低蛋白结合特性,以在其整个面上均匀地分配液体;

b. 将一种或多种试剂加入所述一个或多个孔中,然后施加真空,从而使试剂进入所述一个或多个膜,以及

c. 将一种或多种洗剂加入所述一个或多个孔中,然后施加真空,从而使所述洗剂和任何未结合的试剂通过所述流动分配器、一个或多个膜以及多孔支撑物,并进入所述真空歧管。

8. 如权利要求7所述的方法,其中

i) 重复步骤(b)和(c)一次或多次;或者

ii) 进一步包括检测所述一种或多种生物实体的步骤(d);或者

iii) 进一步包括通过选自放射机构和比色机构的检测装置检测所述一种或多种生物实体的步骤(d);或者

iv) 步骤(b)中的试剂为抗体,在不施加真空的情况下,其在所述一个或多个印迹膜上

/ 其内孵育一段时间。

9. 一种使洗液或含有试剂的液体由含有一种或多种生物实体的一个或多个印迹膜中通过的方法,所述一种或多种生物实体中的至少一种是待检测的,其中所述方法包括:

a. 提供真空歧管 (8),位于所述真空歧管上的多孔支撑物 (4),多孔流动分配器 (12),位于所述流动分配器顶部上的一个或多个孔 (14),其中所述流动分配器是亲水的并且具有低蛋白结合特性,以在其整个面上均匀地分配液体;

b. 将所述含有一种或多种生物实体的一个或多个印迹膜 (10) 放于所述多孔支撑物上,

c. 将所述流动分配器放于所述一个或多个印迹膜的顶部上,向所述流动分配器的孔中加入液体,以及

d. 施加真空,从而吸取所述液体通过所述一个或多个印迹膜。

10. 一种使洗液或含有试剂的液体通过含有一种或多种生物实体的印迹膜的方法,所述一种或多种生物实体中的至少一种是待检测的,其中所述方法包括:

a. 提供一装置,所述装置包括收集歧管 (22)、多孔支撑物 (4)、位于所述多孔支撑物顶部上的多孔流动分配器 (12)、位于所述流动分配器顶部上的一个或多个孔 (14)、以及可拆卸地连接至所述一个或多个孔的顶部上的压力盖 (13),所述盖具有通向其内部的进口 (15),所述进口与正气压源连接,其中所述流动分配器是亲水的并且具有低蛋白结合特性,以在其整个面上均匀地分配液体;

b. 将所述含有一种或多种生物实体的一层或多层印迹膜 (10) 放于所述多孔支撑物上,

c. 将所述流动分配器放于所述一层或多层印迹膜的顶部上,向所述流动分配器的一个或多个孔中加入液体,以及

d. 通过所述进口向所述盖施加正压,从而使所述液体从所述孔经所述一层或多层印迹膜进入所述歧管中。

11. 如权利要求 7、9 或 10 所述的方法,其中设置多个所述试剂孔,每个孔具有其自己的流动分配器。

用于免疫印迹的测定装置及方法

[0001] 对相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于 2006 年 4 月 27 日提交的美国临时申请 No. 60/795452 和于 2005 年 11 月 3 日提交的美国临时申请 No. 任务 60/732994 的优先权。

技术领域

[0003] 本发明涉及一种实验室装置以及采用该装置检测印迹膜中所含物质的位置或存在 / 不存在的方法。更尤其是,其涉及将试剂和洗液施加于印迹膜上从而通过真空或正压完成快速检测的一种技术。

背景技术

[0004] 使用凝胶电泳目前是分离生物材料的一种普遍技术。(非生物材料也可以采用凝胶或其他层析支撑物来分离,但是关于生物材料所做的工作更多)。典型的应用包括在测定序列、检测多态性中分离不同大小的核酸片段;或者在其他情况下确定大小。其它常见的应用为分离蛋白质和糖蛋白,以及采用凝胶进行分离以确定均匀性或纯度。

[0005] 在所有这些过程中,将生物实体的混合样品施加于电泳凝胶,对凝胶施加电场从而分离组分。不论凝胶的展开方式如何,但是必须以某种方式检测样品中所含物质所得到的迁移图形。

[0006] 为了进行检测,典型地将凝胶支撑物与印迹膜接触,将物质转移至印迹膜上,其转移图形与凝胶上的图形相同。然后最低限度地用蛋白或去污剂溶液封闭膜,以减少非特异性结合(否则其将导致高噪声以及低检测水平),从而检测“点”。典型的封闭剂包括酪蛋白、小牛蛋白血清(BSA)、脱脂奶粉的 TBS-T 或 PBS-T 溶液(通常大约 1%)。然后将所述生物实体与对膜上的抗原具有特异性的抗体一起孵育。将膜彻底清洗,以除去任何污染物(例如凝胶残余物)、未结合的封闭蛋白或抗体等。然后用对上述第一抗体特异的与酶、放射性同位素、荧光、或生物素缀合的第二抗体处理并孵育所述膜。再次将膜清洗干净,以除去任何未结合的第二抗体。然后施加检测试剂,通常为生色团、化学发光、荧光、放射性或抗生物素蛋白链霉素标记的材料,其与酶缀合物结合,或者为酶缀合物的底物。最后,采用适当的检测装置检测生物实体的存在、不存在、位置、量等。根据所选择的试剂之间的反应速度、膜和生物实体,最后六步通常需要 3-6 小时至过夜,而且该方法要求将膜在摇动平台上孵育多个时间阶段。大多数研究人员都不喜欢上述费时且消耗(浪费)大量试剂的方法。

[0007] 有些研究人员建议利用吸收材料的毛细管作用,例如放置在膜下的滤纸,吸收剩余液体使其通过膜,提高该方法的速度,尤其是洗涤步骤的速度。

[0008] US 5155049 提及了一个称为 Hybrid-Ease™ 杂交腔室的系统,由 HoeferScientific Instruments 出售。该腔室包括两个格栅,其中夹着膜。栅板卡合在环绕膜的位置,注射器位于由所述格栅产生的开口空隙中。一个注射器用于施加试剂和清洗,另一个用于除去多余物。所述系统要求大量的液体进行操作,在使用上较为笨重,同时也相当耗时。其还提及了在小体积孔(例如 96 孔微滴定板)的某些特定检测中,例如 ELISA 检

测,在洗涤步骤中,其他人采用真空吸取液体通过一个或多个膜。然而,由于其只适用于小体积应用中,而且仍是不可控的,因此,他们对所述工作持怀疑态度。相反,他们提出,更好的办法是采用具有位于滤纸上的膜和覆盖层的人工挤压装置,将膜挤压在两块板之间从而挤压液体通过膜并进入纸中。

[0009] 显然,需要一种更为有效的检测位于印迹膜上的生物材料或实体的方法。本发明允许对位于印迹膜上的生物实体进行更为有效的检测。

发明内容

[0010] 本发明提供一种快速、有效、方便的检测位于印迹膜上一种或多种生物实体的方法。该检测可以涉及生物物质在一个或多个膜上的位置、性质或量。本发明的方法涉及选自正压或真空辅助系统的压力辅助系统,用于提供并除去试剂,采用极少量液体将污染物从位于膜中的待检测物质中清洗去除。该方法能够在大约 30-45 分钟内完成封闭、洗涤和抗体结合步骤,而不损害印迹质量。

[0011] 因此,一方面,本发明涉及一种使液体通过一个或多个膜的方法,所述液体例如是抗体溶液、检测试剂或洗液,而所述膜上具有一种或多种生物物质。所述膜可以例如对应于在电泳凝胶上进行分离的样品的迁移图形。所述膜还可以是测定特异性结合的固体支撑物。

[0012] 该方法尤其适用于经印迹凝胶支撑物而得到的膜,而所述凝胶支撑物已被用于对样品中的材料进行电泳分离或者验证纯度。

[0013] 另一方面,本发明涉及一种用于实施本发明方法的装置。所述装置包括若干层,其中包括位于一层或多层印迹膜下方的多孔支撑层,位于所述印迹膜上的流动分配器,以及位于所述流动分配器上包含至所希望区域的液体并允许具有较小起始体积的所述液体的孔。优选地,所述流动分配器为非结合的或低结合的多孔膜,例如 0.22 微米的膜。

[0014] 所述装置具有位于流动分配器和支撑物之间的一个或多个印迹膜,并将所述装置放置于具有适当尺寸的真空歧管上或其中,或者将压力腔室放置于流动分配器顶部的上方。然后在需要的步骤之间采用真空或正压以实施所述方法,使液体通过膜。

[0015] 本发明的一个目的是提供一种进行真空辅助的免疫测定的装置,所述装置包括多孔支撑物、位于所述多孔支撑物顶部上的流动分配器以及位于所述流动分配器顶部之上的一个或多个试剂孔。

[0016] 本发明的另一目的是提供一种进行正压辅助的免疫测定的装置,所述装置包括多孔支撑物、位于所述多孔支撑物顶部上的流动分配器以及位于所述流动分配器顶部之上的一个或多个试剂孔。

[0017] 本发明的另一目的是提供一种用于真空辅助的免疫测定的装置,所述装置包括真空歧管、位于所述真空歧管上的多孔支撑物、位于所述多孔支撑物顶部上的流动分配器以及位于所述流动分配器顶部之上的一个或多个试剂孔。

[0018] 本发明的另一目的是提供一种进行正压辅助的免疫测定的装置,所述装置包括歧管、位于所述歧管上的多孔支撑物、位于所述多孔支撑物上的一个或多个印迹膜、位于所述一个或多个膜顶部上的流动分配器、位于所述流动分配器顶部之上的一个或多个试剂孔、可拆卸地位于所述流动分配器顶部之上的正压装置。

[0019] 本发明的另一目的是提供一种真空辅助的免疫测定方法,包括以下步骤:

[0020] a. 提供真空歧管、位于所述真空歧管上的多孔支撑物、含有一个或多个待测生物实体的一个或多个膜,所述膜位于所述多孔支撑物上,位于所述膜顶部上流动分配器、以及位于所述流动分配器顶部之上的一个或多个孔,

[0021] b. 将一种或多种试剂加入所述一个或多个孔中,然后施加真空,使所述试剂进入所述膜中,以及

[0022] c. 将一种或多种洗剂加入所述一个或多个孔中,然后施加真空,使所述洗剂和任何未结合的试剂通过所述流动分配器、膜和多孔支撑物进入所述真空歧管中,

[0023] d. 根据要求或需要重复步骤 (b 和 c) 一次或多次。

[0024] 本发明的另一目的是提供一种真空辅助的免疫测定方法,包括以下步骤:

[0025] a. 提供真空歧管、位于所述真空歧管上的多孔支撑物、含有一个或多个待测生物实体的一个或多个膜,所述膜位于所述多孔支撑物上,位于所述膜顶部上的流动分配器、以及位于所述流动分配器顶部之上的一个或多个孔。

[0026] b. 将一种或多种试剂加入所述一个或多个孔中,然后施加真空,使所述试剂进入所述膜中,以及

[0027] c. 将一种或多种洗剂加入所述一个或多个孔中,然后施加真空,使所述洗剂和任何未结合的试剂通过所述流动分配器、膜和多孔支撑物进入所述真空歧管中,

[0028] d. 重复步骤 (b 和 c) 一次或多次。

[0029] 本发明的一个目的是提供一种使洗液或含有试剂的液体通过印迹膜的方法,所述印迹膜含有一种或多种生物实体,其中至少一种实体是待检测的,其中所述方法包括:

[0030] a. 提供真空歧管、位于所述真空歧管上的多孔支撑物、流动分配器、及位于所述流动分配器顶部之上的一个或多个孔,

[0031] b. 将所述含有一种或多种生物实体的一个或多个印迹膜放置于所述多孔支撑物上;

[0032] c. 将所述流动分配器放置在所述印迹膜上,

[0033] d. 将液体加入所述流动分配器的所述孔中,然后施加真空,使所述液体通过所述流动分配器、印迹膜和多孔支撑物进入所述歧管中。

[0034] 本发明的一个目的是提供一种使洗液或含有试剂的液体通过一个或多个印迹膜的方法,所述印迹膜含有一种或多种生物实体,其中至少一种实体是待检测的,其中所述方法包括:

[0035] a. 提供歧管、位于所述歧管上的多孔支撑物、流动分配器、及位于所述流动分配器顶部之上的一个或多个孔,

[0036] b. 将所述含有一种或多种生物实体的一个或多个印迹膜放置于所述多孔支撑物上;

[0037] c. 将所述流动分配器放置在所述印迹膜上,

[0038] d. 将液体加入所述流动分配器的所述孔中,向所述流动分配器施加正压,使所述液体通过所述流动分配器、印迹膜和多孔支撑物进入所述歧管中。

附图说明

- [0039] 附图 1 显示了根据本发明的装置的第一实施例的横截面图。
- [0040] 附图 2 显示了根据本发明的装置的第二实施例的横截面图。
- [0041] 附图 3 显示了根据本发明的装置的第三实施例的横截面图。
- [0042] 附图 4 显示了根据本发明的装置的第四实施例的横截面图。
- [0043] 附图 5A-5C 显示了根据本发明的方法的实施例的框图。
- [0044] 附图 6 显示了根据现有技术和本发明的经处理的印迹例子的结果。

具体实施方式

[0045] 为了完成本发明,采用了根据本发明的一个装置。如附图 1 所示,装置 2 包括多孔支撑物 4。优选地,所述支撑物具有设计安装在歧管 8(以下描述)内或之上的边缘 6 或安装部件。将一层或多层印迹膜 10 放于支撑物 4 顶部上。然后将流动分配器 12 放置或安装在印迹膜 10 上。如果需要,所述流动分配器可以具有一个或多个连接在流动分配器 12 之顶表面 16 上的孔 14(在该实施例中显示一个),或者其可以为简单地连接或放置在流动分配器 12 顶部上的独立部件(未显示)。

[0046] 如附图 1 所示,该实施例中的歧管 8 为真空歧管,具有连接至真空源 20 的端口 18。另外,也可以采用正压(以下进一步描述)以代替真空驱动过滤/洗涤过程。端口 18 位于多孔支撑物 4 的下方。废物收集装置 22 在该例中为一容器,安装在歧管下方,或者如果需要安装在歧管中(未示出),以收集通过装置 2 的液体。另外,该废物收集装置可以为废物排放管或其他本领域普通技术人员知晓的类似装置。

[0047] 流动分配器 12 为一多孔结构。在一个实施例中(所显示的),其整个结构是多孔的。在附图 2 所示的另一实施例中,流动分配器 12A 仅仅在孔 14 内的区域 24 中为多孔的。可以通过以下方式在分配器 12 上提供无孔的区域 17:在区域 17 的孔中填充无孔材料,例如塑料或胶水,或通过加热和/或加压和/或本领域公知的溶剂使区域 17 中的孔塌陷,或形成与孔 14 的外部大小相匹配的分配器 12,并沿着外部尺寸将分配器 12 不透液体地密封在孔 14 的底部。

[0048] 流动分配器 12 可以是任意的多孔结构,使液体在其表面上均匀地分布,而且其足够多孔从而允许在真空的影响下易于移动,其还能够从液体中滤出附聚物、颗粒和其它碎片。

[0049] 所述流动分配器可以具有任意所需的大小。凝胶的多个标准大小为面积大约 7cm×8cm 至 20cm×20cm。

[0050] 所述材料包括但不限于纺织、无纺以及纤维多孔过滤器,例如 **TYVEK®** 或 **TYPAR®** 纸,纤维素材料,例如来自马萨诸塞州 Billerica 的 Millipore 公司的 **MILLISTAK+®** 过滤器,膜,例如微孔膜、烧结膜,例如 **POREX®** 过滤器等。优选的是膜,尤其是塑料微孔膜。

[0051] 所述膜的优选孔径为大约 0.1 至大约 0.65 微米,优选 0.2 至大约 0.45 微米,最优选为大约 0.22 微米。

[0052] 此外,所述优选的过滤器或膜对使用的试剂具有低结合特性,其目的是使使用量降至最低。更优选的是,由于其通常与生物材料一起使用,其是亲水的,并具有低蛋白结合特性。一种所述分配器为由 PVDF 构成的、来自马萨诸塞州 Billerica 的 Millipore 公

司的亲水DURAPORE®膜。另一种是来自马萨诸塞州 Billerica 的 Millipore 公司的 Millipore EXPRESS®亲水 PES 膜。

[0053] 所述多孔支撑物 4 可以是简单的筛子、格栅或烧结的多孔结构,例如 POREX®膜,或粗孔或大孔微孔过滤器,例如无纺纸、聚丙烯或聚乙烯布或 1—10 微米的微孔过滤器。所述支撑物可以由聚合物、陶瓷或包括但不限于金属的金属材料构成,例如不锈钢、钢、钢合金、铝等,所述聚合物例如聚乙烯、聚丙烯、聚砜、苯乙烯、尼龙等。

[0054] 附图 3 显示了采用标准真空歧管 30 的实施例。在该例中,所述歧管具有多孔支撑结构 32,例如塑料或金属格栅或多孔的烧结塑料片或金属片或其他真空领域公知的类似装置。所述印迹膜 34 也放置于支撑物 32 的顶部上,被上述附图 1 和 2 之实施例中描述的流动分配器 36 和孔结构 38 覆盖。

[0055] 附图 4 显示了可以用于本发明中的正压系统。在该实施方案中,与附图 1-3 中相同的元件采用相同的附图标记。

[0056] 如附图 4 中所示,装置 2A 包括多孔支撑物 4。优选地,所述支撑物形成有设计配合入歧管 8 之内或之上的边缘 6 或安装部件。一层或多层印迹膜 10(显示一个)位于支撑物 4 的顶部上。然后将流动分配器 12 放置或安装在印迹膜 10 的顶部上。所述流动分配器可以具有一个或多个连接在流动分配器 12 顶表面 16 的孔 14(在该实施例中显示一个),或者其可以为简单地连接或放置在流动分配器 12 顶部上的独立部件(未显示)。一正压歧管或覆盖物 13 位于孔 14 和 / 或流动分配器 12 上,优选可拆卸地固定在孔 14 和 / 或流动分配器 12 上。所述正压歧管 13 具有通过管 17 与正压源连接的端口 15。正压可以来自泵、高压气体源(罐、筒等)、以及实验室或工业上公知的其他来源。

[0057] 如附图 4 中所示,歧管 8 简单地为一收集歧管,其具有可以用于排出过多压力的端口 18。如果需要,其可以含有空气过滤器,以防止污染物的进入。所述端口 18 位于多孔支撑物 4 之下。废物收集装置 22,在该例中为容器,位于歧管下方,或者如果需要,位于歧管内(未示出)以收集通过装置 2 的液体。或者,所述废物收集装置可以为废物排放管或者本领域普通技术人员知晓的其它类似装置。

[0058] 在本发明中可以采用不同的方法。关键因素在于它们均依赖于真空或正压驱动的液体过滤,而不是过去的静态扩散。

[0059] 最简单的方法是简单地采用本发明以进行一个或多个洗涤周期。典型地,每个洗涤周期包括一个或多个洗涤步骤。通常,每周期使用 2-5 个步骤。

[0060] 另一方法是在每个需要将液体从印迹膜中除去的步骤中采用本发明,例如在孵育抗体之后或者在洗涤步骤中。

[0061] 在所有这些方法中,可以采用适于将液体从装置中除去并进入歧管的任意压力。根据选择用于印迹的膜和流动分配器、采用的歧管、需要的过滤速度以及可以提供给研究者的真空源或正压源,所述压力可以改变。

[0062] 通常,可用的真空可以为 100 至 760mmHg(133 毫巴和 1013 毫巴)。可以采用阀、压力限制器等使真空保持在所采用膜的允许范围内。本发明一个实施例中的优选真空歧管为 STERICUP®装置真空基底,采用的真空为大约 100mmHg。其它适当的真空歧管包括但不限于马萨诸塞州 Billerica 的 Millipore 公司的 MULTISCREEN™ 和 MULTISCREEN_{HTS} 真空歧管。

[0063] 通常,正压由压力为大约 2psi 至大约 15psi 的空气管提供。也可以采用阀、压力限制器等使所述压力保持在所采用膜的允许范围内。所述压力系统包括但不限于马萨诸塞州 Billerica 的 Millipore 公司的 Amicon® 搅拌单元装置和马萨诸塞州 Hopkinton 的 Caliper Life Sciences 的正压过滤单元。

[0064] 附图 5A-C 中以框图显示了典型的过程。

[0065] 在附图 5A 中,提供一种根据本发明的装置,步骤 50 中,其与真空歧管和真空源连接。步骤 52 中,所述印迹膜放置在该装置的适当位置上。优选地,步骤 52 中的印迹膜预先被湿润(未示出)。在步骤 54 中打开真空,并将液体例如洗液放于一个或多个孔中。在步骤 56 中,继续所述真空,直至所述液体被吸取通过所述装置,然后关闭真空。当采用多于一个的印迹膜时,它们可以顺序地位于各自的顶部,在一个处理步骤中,含有同样的所需试剂的足量液体可以轻易地通过所述多层膜。当采用多层时,通常优选的是采用 2 至 10 层,更优选的是一次采用 2 至 5 层。或者,可以采用具有多个孔的流动分配器,以及采用相互平行的多于一个的印迹膜,每个膜在流动分配器上均具有各自的孔,每个均具有其特定目的所要求的各自一组试剂。如果需要,可以在相邻孔中采用多层。

[0066] 在附图 5B 中,删除了步骤 54,在步骤 58 中关闭真空加入液体,并进行孵育,例如需要与第一抗体或第二抗体孵育。然后在步骤 60 中打开真空。

[0067] 在附图 5C 中,55A 和 55B 的步骤结合为连续步骤。可以根据需要重复任一步骤或两个步骤,或者根据需要以不同顺序实施适当的处理。

[0068] 可选地,如果希望,可以将一盘子或单个孔装置放于膜支撑物下方,优选位于歧管内。然后可以收集可能比较昂贵而且可以在以后的测定中重复使用的单个未结合试剂。可选地,其可以分为两个或多个小盘。

[0069] 其它方法也可以采用本发明的装置。

[0070] 尽管根据试验设计可以改变抗体浓度,但是对于标准方法来说 10-1000ng/mL 为典型的范围。封闭、抗体反应以及洗涤所需的溶液体积典型地分别为 0.1mL/cm²、0.03mL/cm² 和 1.0mL/cm²。

[0071] 所述膜的孔隙中含有一种或多种待测物质。通常,这些物质通过电泳或色谱的固体支撑物印迹至或直接施加至孔隙中,通常用于检测特定类型材料的存在、不存在或量,例如抗体或特定蛋白质—即上述的 Dot-Blot(点印迹)类型测定。虽然膜的定义并不局限于这些例子,但是适用于一个或多个膜的孔隙中含有一种或多种待测物质的情况。预想可以用于本发明的膜类型包括通常用于印迹电泳凝胶的膜,例如硝酸纤维素;尼龙;或者各种其它聚合物膜,例如聚偏氟乙烯(PVDF),例如马萨诸塞州 Billerica 的 Millipore 公司出售的 immobilon™ 膜。

[0072] 可以采用大量材料以再现本领域知晓的各种样品所得到的电泳凝胶结果。最常见的是,所述样品含有生物物质,例如各种蛋白质、抗体、核酸、寡核苷酸、复杂的碳水化合物等,但是该技术的应用并不局限于这些物质。本发明的技术适用于其中含有待测物质的任意膜,而不需考虑膜或靶物质的化学组成。

[0073] 当采用代表电泳结果的复制品的膜时,可以通过对凝胶进行电洗脱、电印迹或半干印迹,采用含有转移缓冲液的膜将待测物质从凝胶转移至膜上。转移的技术是本领域公知的,在此处不构成本发明的一部分。

[0074] 提供的液体可以含有检测试剂或简单地可以为洗液。当然,检测试剂的性质依赖于待检测的物质。典型地,蛋白质通过抗原和抗体之间的免疫反应或者其免疫活性部分进行检测;典型地,核酸片段的存在通过适当的寡核苷酸探针检测。如果需要,与待测物质发生即时或特异反应的检测物质可以进而配备标记物,可能需要检测试剂的多种应用—例如,一方案可以包括通过提供标记有酶的抗体来检测抗原,所述酶例如常见的辣根过氧化物酶,然后通过提供该酶的底物来检测所述结合。在使用试剂时,虽然不是优选,但是可以仅仅采用正压供体基质以将膜的该组分暴露—指定时间阶段。

[0075] 最方便地是在室温下实施本发明方法,但是也可以用于较高和较低的温度。其可以通过加热所述装置或其周围环境(例如在加热箱或冷却箱中)来实现。

[0076] 在本装置和方法中,将之前已经结合的抗体从印迹中抽提出来,之后与抗体或其它对靶蛋白特异的探针孵育,从而顺序地采用多个抗体或探针对印迹进行分析。所述抽提过程破坏了抗原—抗体之间的结合,并将抗体溶解于周围的缓冲液中。其通常通过去污剂和热的结合或者暴露于高 pH 或低 pH 来实现。所述装置与流动分配器结合能够采用高 pH 或低 pH 法来抽提印迹。接下来的直接或存储后对印迹的再检测可以采用与初始检测相同的方案。适当的用于抽提印迹的试剂盒有来自 Chemicon International Inc 的商品名为 ReBlot Plus 试剂盒(目录号 #2500)、Re-Blot Plus-Mild 溶液(目录号 #2502)以及 Re-Blot Plus-Strong 溶液(目录号 #2504)。

[0077] 在标准的 western 印迹中,抗原或靶转移至一个或多个膜支撑物上,并且用适当的探针如抗体、蛋白质(例如蛋白 A)或凝集素(与碳水化合物部分结合的蛋白或糖蛋白)进行检测。在某些应用中,采用反向模式(例如反向阵列),其中将抗体或其它探针点样于一个或多个膜上或者其它支撑物(典型地以阵列形式)上,将抗原或靶呈递于固定在阵列上的抗体。可以通过标记抗原或靶或者采用靶特异性的第二抗体来视觉观察靶—探针结合的发生。反向阵列通常采用靶的混合物,例如标记有不同荧光颜色基团的溶解产物,从而能够平行处理。反向测定也可以用于本发明。

[0078] 实施例

[0079] 制备附图 1 的装置,其中采用 **STERICUP®** 装置(获自马萨诸塞州 Billeria 的 Millipore 公司)的基底作为真空歧管,**Porex®** 的多孔塑料片作为多孔支撑物,0.22 微米孔径的 **Durapore®** 亲水膜(GVPP)作为流动分配器,以及聚苯乙烯条孔(典型地,比膜的尺寸大 4mm,例如,相对于 72mm×82mm 为 76mm(L)×86mm(W)×25mm(H)),将所述条弯成 90° 以形成四个角,采用 Loctite 的 3211 光固粘结剂,将条的端部相互密封起来,从而形成所述孔。采用所述 Loctite 的 3211 光固粘结剂将所述孔粘贴至膜表面。

[0080] 通过真空端口将上述基底连接至带阀的真空管线。

[0081] 将预先湿润(在 100% 甲醇中预湿,然后在水中预湿)的、含有小牛肝脏溶解样品的印迹膜(马萨诸塞州 Billeria 的 Millipore 公司的 **IMMOBILION™** Western 印迹膜)放置于基底上,除去基底和膜之间的所有气泡。将流动分配器放置在印迹膜的顶部上。除去基底和膜之间的所有气泡。施加 100mmHg 的真空,然后向孔中加入 10ml 封闭液(TBS-T(Tris 缓冲盐和 **Tween®**-20 表面活性剂:20mM Tris-Cl, PH7.6, 0.8% 氯化钠, 0.1% **Tween®**-20 表面活性剂)中的 1% 酪蛋白)。然后关闭真空。将 1ml 经稀释的兔抗-ERK 第一抗体(用 TBS-T 中的 1% 酪蛋白以 1:2000 稀释)加入孔中,在没有真空的条件下孵育 10 分钟。施

加 100mmHg 的真空以过滤剩余的抗体液体。真空下加入 30ml TBS-T 洗液,并过滤(直至干燥)。在真空下顺序加入洗液三次,每次 30ml TBS-T 洗液,并过滤。然后关闭真空,将 1ml 经稀释的第二抗体(结合碱性磷酸酶的羊抗兔 IgG 抗体)(用 TBS-T 中的 1%酪蛋白以 1:1000 稀释)加入孔中,并在没有真空的条件下孵育 10 分钟。然后施加 100mmHg 的真空使剩余的抗体液体过滤通过流动分配器。在真空下顺序加入洗液四次,每次 30ml TBS-T 洗液,并过滤,然后关闭真空。将底物(Immobilon™ WesternAP 试剂)加入孔中并进行检测。将膜暴露于 X 射线胶片 1 分钟,用胶片显影剂处理所述胶片。

[0082] 在 3 小时以上的时间内实施比较例,其中采用传统的方法,以及相同类型的膜、蛋白(ERK)和试剂。

[0083] 1. 用 1%酪蛋白/TBS-T 封闭膜一小时(0.1mL/cm²膜);

[0084] 2. 加入抗 ERK 抗体(用 TBS-T 中的 1%酪蛋白以 1:10000 稀释),孵育 1 小时(0.1mL/cm²膜);

[0085] 3. 在 5 分钟内用 TBS-T 洗涤四次(1.0mL/cm²膜);

[0086] 4. 加入第二抗体(抗兔 IgG-碱性磷酸酶缀合物,经 TBS-T 中的 1%酪蛋白以 1:5000 稀释),孵育 1 小时(0.1mL/cm²膜);

[0087] 5. 在 5 分钟内用 TBS-T 洗涤四次(1.0mL/cm²膜);

[0088] 6. 加入 Immobilon™ WesternAP 试剂,孵育 5 分钟(0.05mL/cm²膜);

[0089] 7. 暴露于 X 线胶片 1 分钟,然后显影。

[0090] 附图 6 显示了比较例和根据本发明装置和方法的实施例。该图显示了在仅仅 30 分钟内可以实现高质量的检测。另外,与传统方法相比,在本发明的方法中所使用的抗体量减少了一半,而传统例子的十分之一体积的浓度增加了 5 倍。其不仅使研究者能够进行更多的试验,同时还减少了试剂用量,并得到了高质量的结果。而且与传统方法相比,背景噪音显著减少。

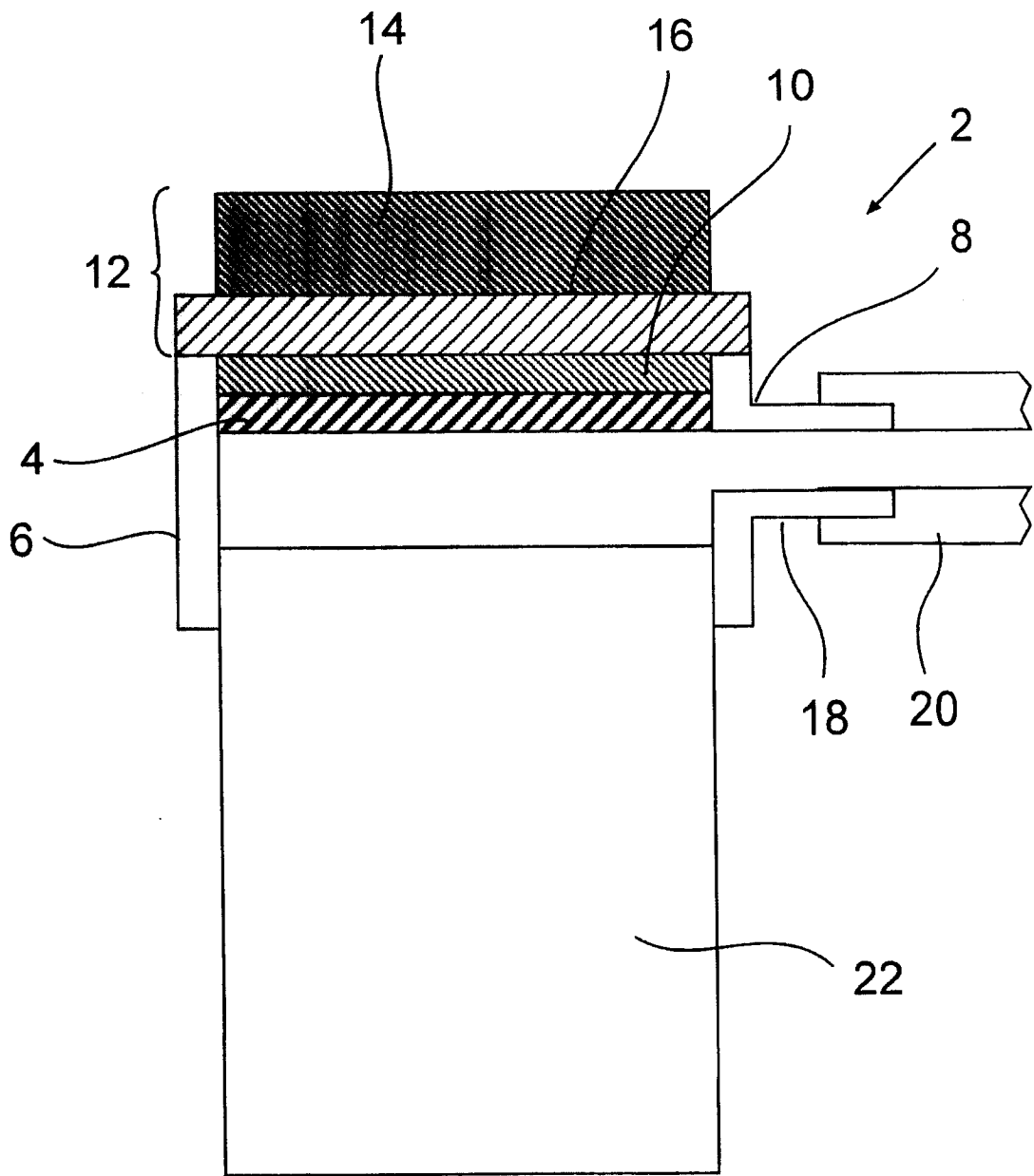


图 1

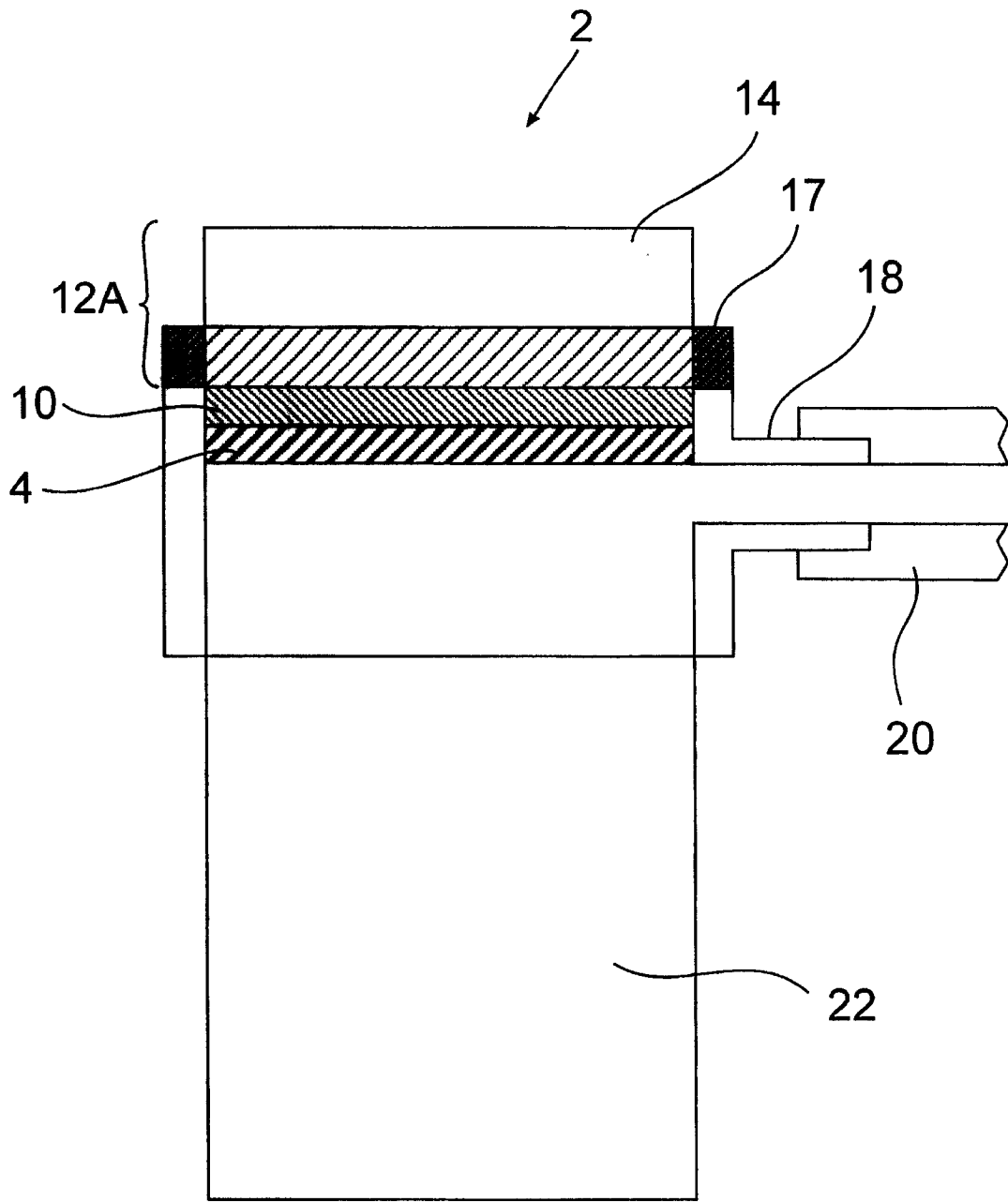


图 2

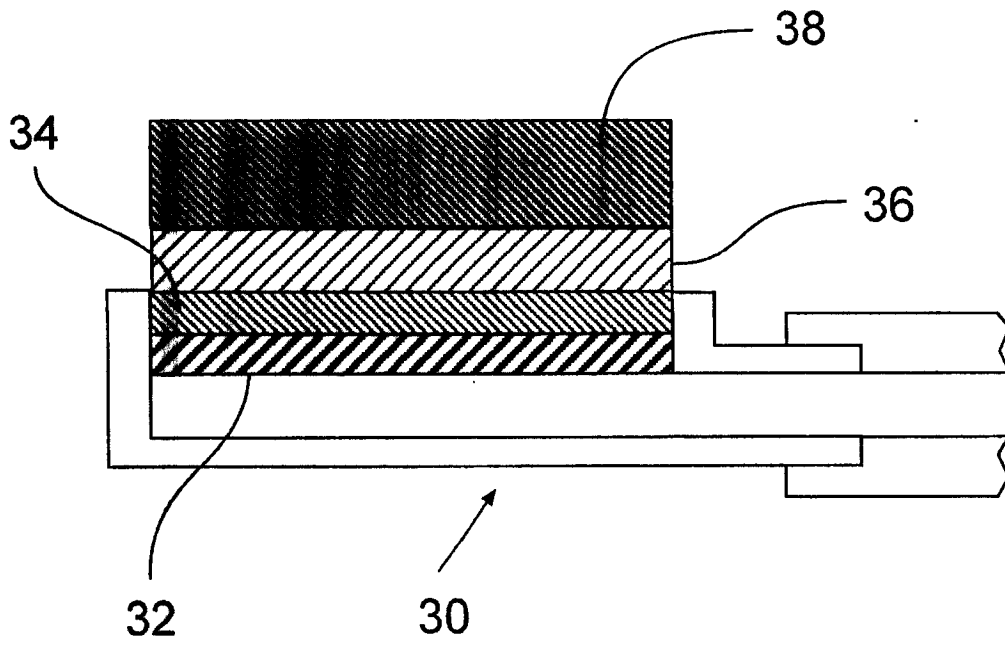


图 3

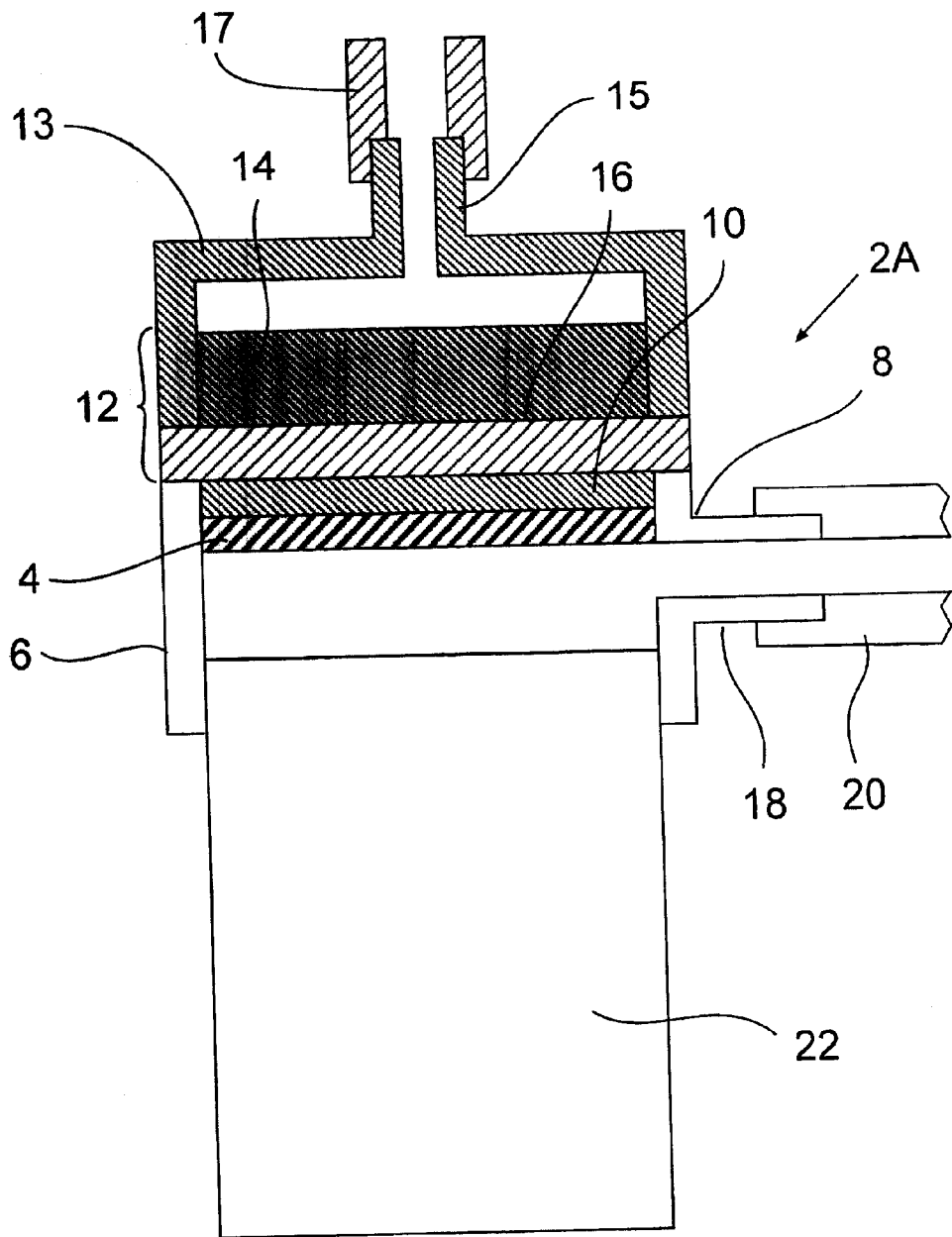


图 4

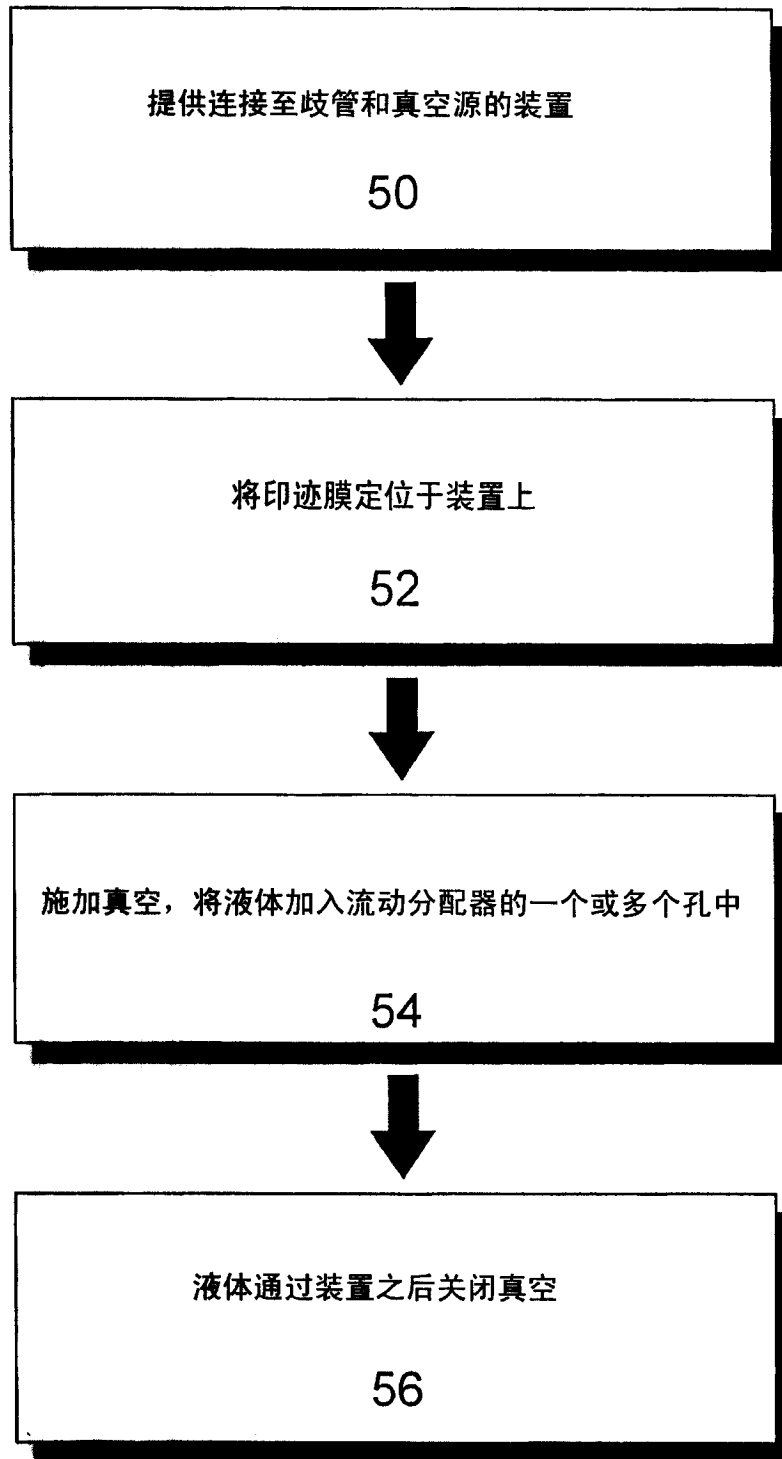


图 5A

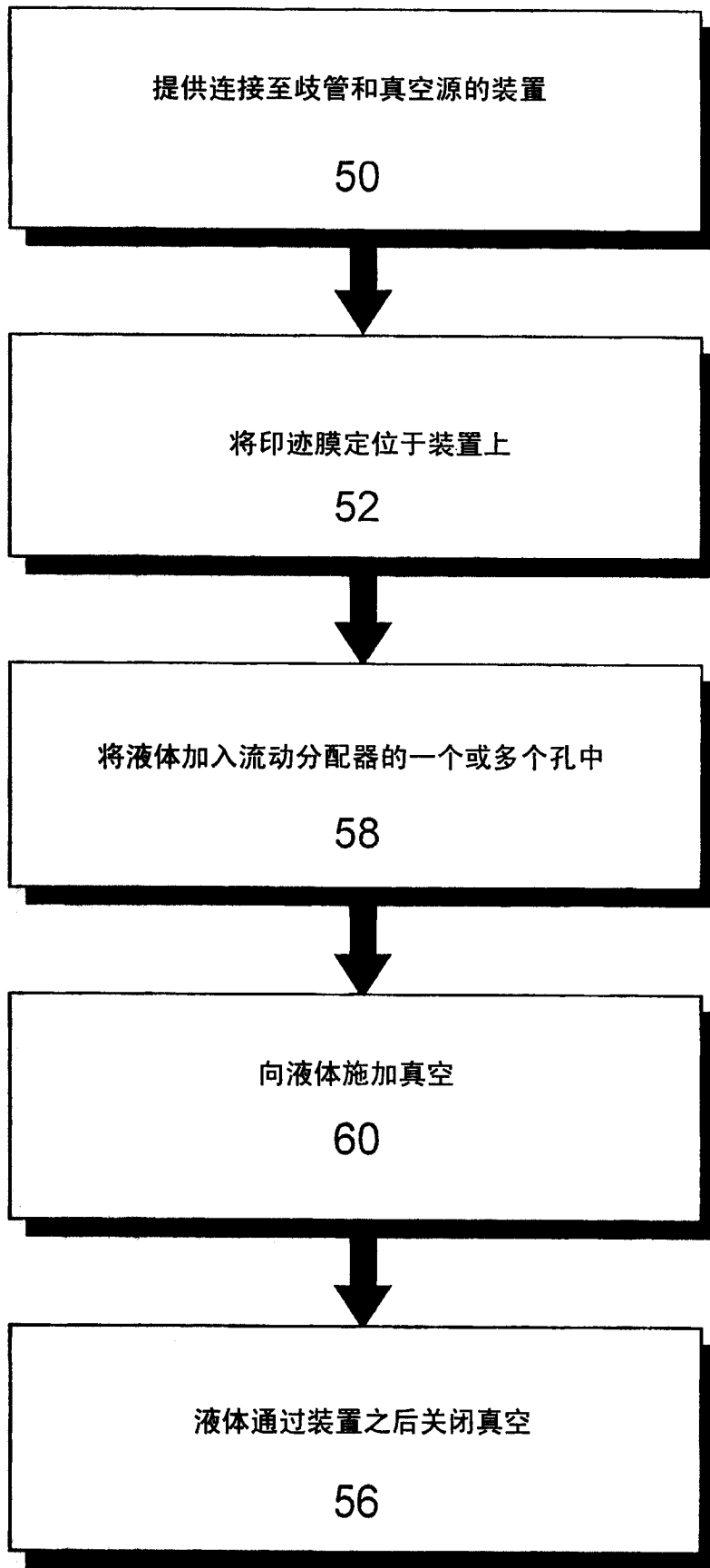


图 5B

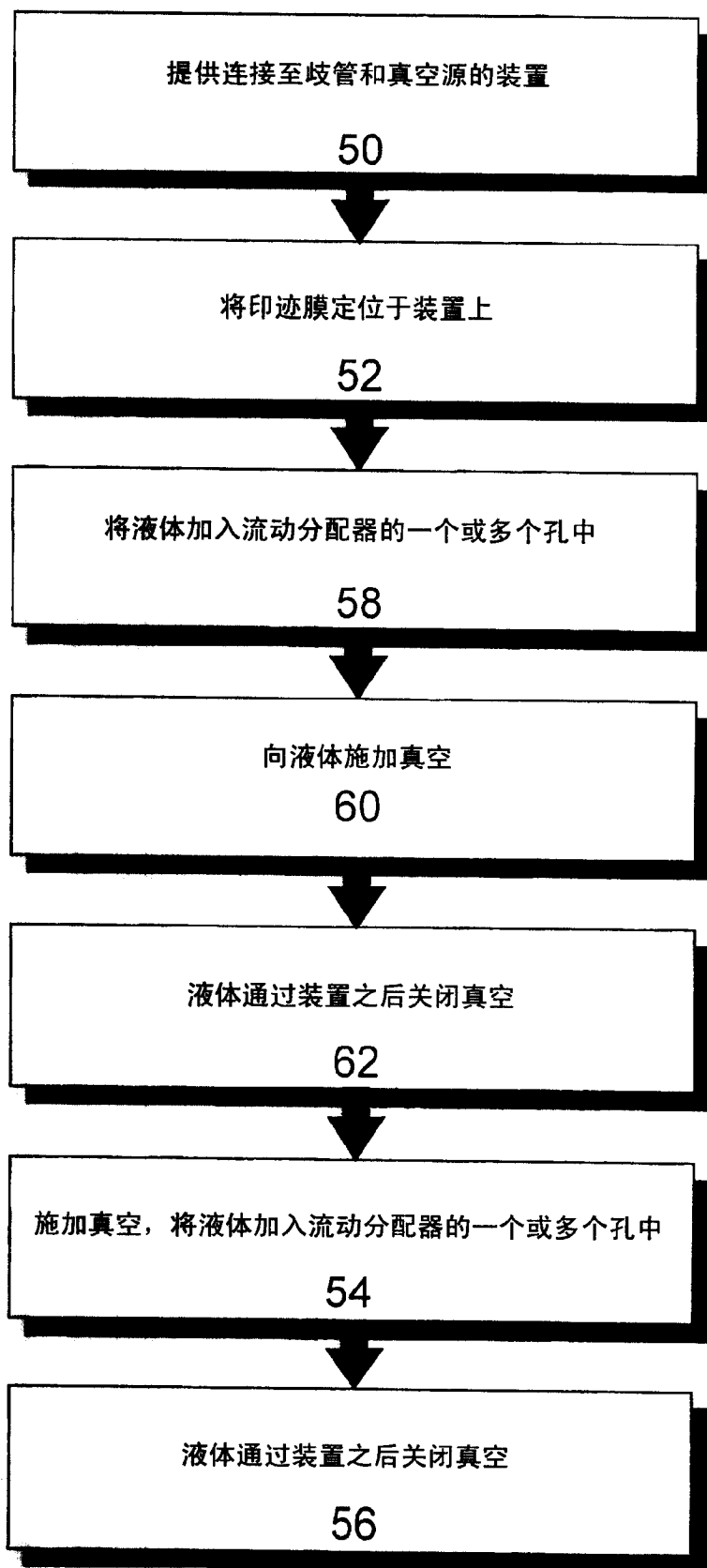
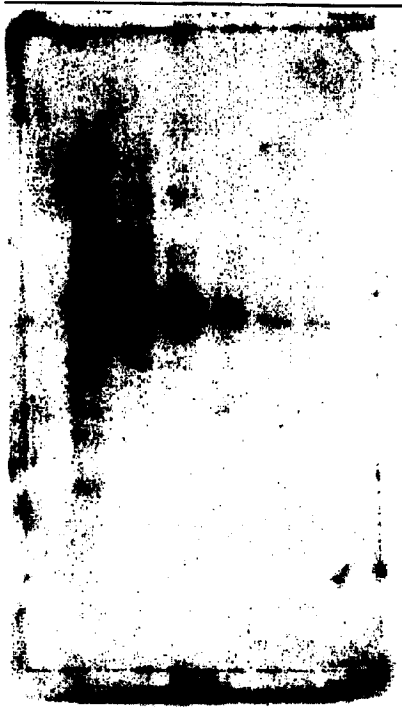


图 5C



实施例



比较例

图 6

专利名称(译)	用于免疫印迹的测定装置及方法		
公开(公告)号	CN1979163B	公开(公告)日	2012-06-27
申请号	CN200610064775.0	申请日	2006-11-03
[标]申请(专利权)人(译)	EMD密理博公司		
申请(专利权)人(译)	米利波尔公司		
当前申请(专利权)人(译)	EMD密理博公司		
[标]发明人	马渊雅治 木村广子 马克埃梅里克 菲利普克拉克 库尔特格里尼兹恩		
发明人	马渊雅治 木村广子 马克·埃梅里克 菲利普·克拉克 库尔特·格里尼兹恩		
IPC分类号	G01N33/53		
优先权	60/795452 2006-04-27 US 60/732994 2005-11-03 US		
其他公开文献	CN1979163A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种快速、有效、方便地检测位于印迹膜上的一种或多种生物实体的方法。本发明的方法涉及压力辅助的方法以提供和除去试剂，并允许用极少体积的液体将污染物从膜上的待测物质中洗去。在另一方面，本发明提供一种用于实施本发明方法的装置，其包括若干层，包括位于印迹膜下方的多孔支撑物，位于印迹膜上方的流动分配器，以及位于流动分配器上使液体至所希望区域的孔，并允许使用较少起始体积的所述液体。优选地，所述流动分配器为非结合或低结合的亲水多孔膜，例如0.22微米的膜。

