



# [12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200610064776.5

[43] 公开日 2007年6月13日

[11] 公开号 CN 1979164A

[22] 申请日 2006.11.3

[21] 申请号 200610064776.5

[30] 优先权

[32] 2005.11.3 [33] US [31] 60/732,994

[32] 2006.4.27 [33] US [31] 60/795,452

[32] 2006.4.27 [33] US [31] 60/795,532

[71] 申请人 米利波尔公司

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  
代理人 过晓东

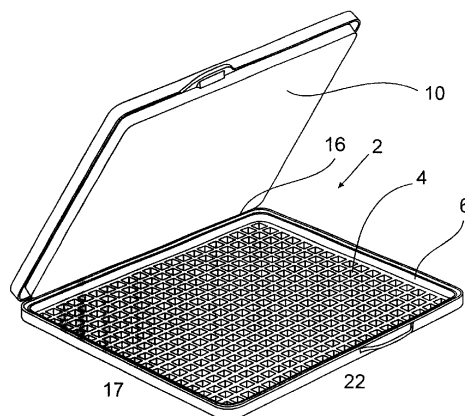
权利要求书 3 页 说明书 13 页 附图 12 页

[54] 发明名称

免疫产品及方法

[57] 摘要

本发明涉及一种用于检测印迹膜上化合物的装置。所述装置由若干层组成，包括印迹膜下方的多孔支撑物层，印迹膜上方的流动分配器，以及可选的位于流动分配器上使液体至所希望区域的孔，所述孔允许所述液体具有非常小的起始体积。优选地，所述流动分配器为无结合的或低结合的亲水多孔膜，例如 0.22 微米的膜，所述支撑物为一格栅或烧结的多孔材料。所述分配器和支撑物结合在一起，并在膜周围形成外壳。优选采用铰链、夹子和其他类似装置来实现。



1. 一种进行免疫测定的装置，包括由多孔支撑物和流动分配器构成的夹持器，其中所述夹持器具有能够可拆卸地将支撑物和流动器相互固定在一起的器具。

2. 如权利要求1所述的装置，其中所述能够可拆卸地将支撑物和流动器相互固定在一起的器具为选自以下组的形式：铰链、夹子、松紧带、粘接剂、球窝式连接、销钉和凹槽、或合作接合的紧固件。

3. 如权利要求1所述的装置，其中所述能够可拆卸地将支撑物和流动器相互固定在一起的器具为铰链。

4. 如权利要求1所述的装置，其中所述流动分配器具有下表面和上表面，并且所述上表面设置有一个或多个位于所述流动分配器的上表面上的孔。

5. 如权利要求1所述的装置，其中所述流动分配器具有下表面和上表面，并且所述上表面设置有一个或多个位于所述流动分配器的上表面上的孔，其中所述一个或多个孔为单独形成的部分。

6. 如权利要求1所述的装置，其中所述流动分配器具有下表面和上表面，并且所述上表面设置有一个或多个位于所述流动分配器的上表面上的孔，其中所述一个或多个孔为与所述流动分配器的上表面一体形成的部分。

7. 如权利要求1所述的装置，其中所述夹持器由选自以下组的材料构成：塑料、纸、金属、陶瓷及其组合。

8. 如权利要求1所述的装置，进一步包括位于夹持器下方用于回收试剂的收集盘。

9. 如权利要求 1 所述的装置, 进一步包括位于夹持器下方用于回收试剂的收集盘, 其中所述盘分为两个或多个独立的小盘。

10. 一种进行真空辅助免疫测定的装置, 包括真空歧管和夹持器, 所述夹持器由多孔支撑物和流动分配器构成, 其中所述夹持器具有能够可拆卸地将支撑物和流动器相互固定在一起的器具。

11. 一种进行真空辅助免疫测定的装置, 包括真空歧管和一个或多个夹持器, 所述夹持器由多孔支撑物和流动分配器构成, 其中所述夹持器具有能够可拆卸地将支撑物和流动器相互固定在一起的器具, 含有一种或多种待测定生物实体的一个或多个膜, 所述一个或多个膜位于所述多孔支撑物上, 流动分配器位于所述一个或多个膜上。

12. 一种进行压力辅助免疫测定的装置, 包括收集歧管和一个或多个夹持器, 所述夹持器由多孔支撑物和流动分配器构成, 其中所述一个或多个夹持器具有能够可拆卸地将支撑物和流动器相互固定在一起的器具, 含有一种或多种待测定生物实体的一个或多个膜, 所述一个或多个膜位于所述多孔支撑物顶部上, 所述流动分配器位于所述一个或多个膜顶部上, 一个或多个位于所述流动分配器顶部上的试剂孔, 可拆卸地密封在所述一个或多个试剂孔顶部上的压力帽, 所述帽具有一个通向孔内部的进口, 所述进口与正气压源连接。

13. 如权利要求 1 所述的装置, 其中所述流动分配器为一膜。

14. 如权利要求 10 所述的装置, 进一步包括位于夹持器下方用于收集试剂的收集盘。

15. 如权利要求 10 所述的装置, 进一步包括位于夹持器下方用于收集试剂的收集盘, 其中所述盘分为两个或多个独立的小盘。

16. 如权利要求 10 所述的装置, 进一步包括位于夹持器下游用于结合和洗

脱试剂的吸收基质。

17. 如权利要求 10 所述的装置，进一步包括位于夹持器下游用于结合和洗脱试剂的吸收基质，其中所述基质为整体料（monolith）的形式。

18. 如权利要求 1 所述的装置，其中所述流动分配器具有下表面和上表面，并且所述上表面设置有一个或多个位于所述流动分配器的上表面上的孔。

19. 如权利要求 1 所述的装置，其中所述夹持器具有多于一个的流动分配器，每个流动分配器具有下表面和上表面，并在每个所述流动分配器的上表面设置有一个孔。

20. 如权利要求 10 所述的装置，进一步包括位于夹持器下方的用于收集试剂的收集盘以及具有一个或多个凹槽和开口的多孔支撑物，其中所述开口位于所述收集盘外周以内。

21. 如权利要求 11 所述的装置，其中具有两个相互独立操作的夹持器。

22. 如权利要求 11 所述的装置，其中具有两个同时操作的夹持器。

23. 如权利要求 12 所述的装置，其中具有两个独立操作的夹持器。

24. 如权利要求 12 所述的装置，其中具有两个同时操作的夹持器。

## 免疫产品及方法

### 对相关申请的交叉引用

本申请要求于2006年4月27日提交的美国临时申请No.60/795452、于2006年4月27日提交的美国临时申请No.60/795532、和于2005年11月3日提交的美国临时申请NO.60/732994的优先权。

### 技术领域

本发明涉及一种检测印迹膜中所含物质的位置的装置和方法。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快速检测的一种技术。

### 背景技术

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。

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。

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）、含有TWEEN®表面活性剂的Tris缓冲盐溶液（TBS-T溶液）或含有TWEEN®表面活性剂的磷酸盐缓冲盐溶液（PBS-T溶液）中的脱脂奶粉（通常大约1-5%）。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。

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。

US 5155049 提及了一个称为 Hybrid-Ease™杂交腔室的系统，由 Hoefer Scientific 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。

在2005年11月3日提交的USSN 60/732994中提出，采用由若干层构成的装置，包括位于一层或多层印迹膜下的多孔支撑层，位于所述印迹膜上的流动分配器，以及位于该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或低结合的多孔膜，例如0.22微米的膜。所述装置各层按顺序组装起来，然后真空或压力过滤以进行洗涤，并检测位于膜上的生物实体。

显然，需要一种更为有效地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

在一个实施例中，本发明提供一种用于实施本发明方法的装置。所述装置包括由下方的多孔支撑层和上方的流动分配器构成的印迹膜夹持器。所述多孔支撑层和流动分配器通过例如铰接、夹子、弹性带、粘接剂、球窝式连接、销钉和凹槽等方法或者通过接合紧固件或其他类似装置结合在一起。所述夹持器打开，将一个或多个印迹膜放于下层和上层之间。然后密封所述夹持器，将其置于歧管内或特定设备中（以下描述）对印迹膜上的样品进行处理。在一个实施方案中，所述流动分配器具有沿着该流动分配器向上延伸的外周壁，从而形成容纳试剂和洗液的孔。

在另一实施方案中，所述孔和流动分配器分为两个或更多个小孔，从而平行处理多个印迹膜或一个印迹膜的各子部分，每个膜典型地用至少一种不同试剂处理。

在另一实施方案中，所述流动分配器为无结合或低结合的多孔膜，例如 0.22 微米的膜。

在另一实施方案中，多孔柔性膜例如滤纸或玻璃纸位于所述印迹膜之下以及所述多孔支撑物之上，从而当所述流动分配器膜相对于所述印迹膜被固定时，所述柔性膜发生变形，以确保所述印迹膜和流动分配器之间完全相配并均匀的流动。

在另一实施方案中，所述夹持器具有在所述流动分配器上一体形成的孔，从而在处理试剂和 / 或洗液的过程中容纳试剂和 / 或洗液。

其它实施方案包括设计用于保持所述夹持器并进行过滤步骤的压力歧管或真空歧管。在一个实施方案中，当所述歧管盖子关闭时，单独的孔装置直接或通过接触邻近所述流动分配器的顶部放置。在另一实施方案中，所述孔一体形成于流动分配器上。

在另一实施方案中，本发明提供一种快速、有效、方便地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，用于向印迹膜中提供试剂以及将试剂从印迹膜中除去，而且采用极少量的液体和试剂，允许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。人们可以简单地

拿起夹持器并打开，将印迹膜放于其中一个表面上，从而当所述装置环绕着膜闭合时，印迹膜的下表面与多孔支撑物相邻，而印迹膜的上表面与流动分配器相邻。将该装置放于具有压力或真空源的歧管之上或之内，开始该过程。

本发明的一个目的是提供一种进行压力或真空辅助免疫测定的装置，包括用于一个或多个印迹膜的夹持器，其由结合在一起的多孔支撑物和流动分配器构成。

本发明的另一个目的是提供一种进行压力或真空辅助免疫测定的装置，包括用于一个或多个印迹膜的夹持器，其由可拆卸地结合在一起的多孔支撑物和流动分配器构成，所述流动分配器具有从其上表面向上延伸的壁，其在流动分配器上形成一个或多个试剂孔。

本发明的另一个目的是提供一种对一个或多个印迹膜进行真空辅助免疫测定的装置，包括真空歧管和用于所述一个或多个印迹膜的夹持器，所述夹持器由结合在一起的多孔支撑物和流动分配器构成。

本发明的另一个目的是提供一种对一个或多个印迹进行压力或真空辅助免疫测定的装置，所述装置包括真空歧管、处理所述印迹的夹持器、以及收集一种或多种抗体的器具。

本发明的另一个目的是提供一种进行正压辅助免疫测定的装置，包括歧管，用于一个或多个印迹膜的夹持器，所述夹持器由结合在一起的多孔支撑物和流动分配器构成，还包括可拆卸地安装在所述流动分配器上的正压装置。

本发明的另一个目的是提供一种对一个或多个膜进行压力辅助免疫测定的方法，包括以下步骤：

a. 提供真空歧管，用于所述一个或多个印迹膜的夹持器，所述夹持器由结合在一起的多孔支撑物和流动分配器构成，含有一种或多种待测定生物实体的一个或多个膜，所述膜位于所述多孔支撑物上，位于膜上的流动分配器，以及一个或多个位于所述夹持器的流动分配器部分上的孔，

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

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，以及

d. 根据要求或需要重复步骤 (b 和 c) 一次或多次。

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:

a. 提供真空歧管、用于所述一个或多个印迹膜的夹持器, 所述夹持器由结合在一起的多孔支撑物和流动分配器构成,

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夹持器中, 从而当装置环绕着膜闭合时, 所述印迹膜的下表面邻近所述多孔支撑物, 而所述印迹膜的上表面邻近所述流动分配器,

c. 将夹持器紧紧地闭合, 以及

d. 将液体加入流动分配器的顶部上, 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。

本发明的一个目的是提供一种使洗液或含有试剂的液体由一或多个印迹膜中通过的方法, 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:

a. 提供歧管、用于一个或多个印迹膜的夹持器, 所述夹持器由结合在一起的多孔支撑物和流动分配器构成,

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夹持器中, 从而当装置环绕着所述印迹膜闭合时, 所述印迹膜的下表面邻近所述多孔支撑物, 而所述印迹膜的上表面邻近所述流动分配器,

c. 将所述夹持器紧紧地闭合, 以及

d. 将液体加入所述流动分配器上, 然后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

附图 1 显示了根据本发明的装置的第一实施例的透视图。

附图 2 显示了根据本发明的装置的第二实施例的透视图。

附图 3 显示了安装在歧管上的根据本发明的装置的横截面图。

附图 4 显示了根据本发明的位于歧管中的装置的实施例的透视图。

附图 5 显示了根据本发明的装置的第三实施例的透视图。

附图 6 显示了根据本发明的装置的第四实施例的透视图。

附图 7 显示了根据本发明的试剂收集装置的实施例的透视图。

附图 8 显示了根据本发明的位于歧管上的装置的优选实施例的透视图。

附图 9A 和 B 显示了本发明装置的另一实施例。

附图 10 显示了所述多孔支撑物的一个实施例的透视图。

附图 11 显示了所述多孔支撑物的一供选实施例的透视图。

附图 12 显示了本发明的一个实施例的透视图。

## 具体实施方式

如附图 1 所示，夹持器 2 包括两个部分。第一部分或下部为多孔支撑物 4。优选地，所述支撑物具有设计安装在歧管 8（附图 3）内或之上的一边缘 6 或安装部件。将一层或多层印迹膜（未示出）放于支撑物 4 上，从而一个或多个膜的底表面与支撑物的上表面接触。夹持器 2 的第二部分为紧挨着所述一层或多层印迹膜上方的多孔流动分配器（未示出）。

至少在使用过程中，所述顶部 10 和底部 4 部件优选相互结合在一起，从而牢牢地固定所述一个或多个膜。如附图 1 和 2 所示，夹持器 2 的这两个部分 4 和 10 通过铰链 16 连接在一起。如该实施例中所示，所述“铰链”为将两个部分连接在一起的“活”铰链。或者，可以单独制作所述铰链并采用粘接剂、热粘合剂或机械紧固件连接。其它实施例中没有采用铰链（未显示），而在顶部和底部上或其中分别采用了夹子、弹性带或配合结合紧固件，例如狭槽和棘爪、摩擦配合销钉等形式，在使用过程中将它们结合在一起。其它类似的装置对于本领域技术人员来说显而易见的，其意味着也包括它们。

可选地而且是优选地，所述流动分配器 10 可以具有一个或多个在使用过程中容纳洗液和试剂的孔 12。在附图 5 中，夹持器 2 显示具有两个孔 12。所述孔 12 可以形成为流动分配器 10 的顶表面 14 的一部分（附图 2），或者为简单地连接至或位于流动分配器 10 上的独立部件 12（附图 3）。

附图 6 显示了夹持器的另一实施例，其为由薄膜例如塑料或纸构成的组件。其应足够地厚，从而能够自支撑，而且应足够地薄，从而可以折叠。所述夹持器 2 是厚度为 0.005”至 0.060”的膜。所述膜具有沿着夹持器 2 的宽度延伸的折叠线 20。所述膜具有两个开口，当夹持器闭合折叠时，所述开口对齐。覆盖一

个开口的是流动分配器膜 10，而覆盖另一个开口的是多孔支撑物 4。所述多孔支撑物开口的外部而且环绕所述开口的是密封或连接材料 19，例如可再次密封的粘接剂。所述连接材料 19 在处理和使用过程中使夹持器连接在一起。对于本领域技术人员来说以下是显而易见的，即夹持器 2 可以由两个膜构成，并具有一独立的材料，例如粘接剂背衬膜，从而提供折叠线 20 的功能。

如附图 3 所示，该实施例中歧管 8 为真空歧管，其具有连接至真空源 20 的端口 18。或者，可以采用正压以代替真空，通过简单地将具有加压空气或其它气体源的压力风罩放置在夹持器 2 的上方（在该实施例中，端口 18 简单地作为加压空气 / 气体的排出口），从而驱动过滤 / 洗涤过程。所述端口 18 位于多孔支撑物 32 的下方。一废物收集装置 22，在该例中为一容器，位于歧管的下方，或者如果需要位于歧管内，从而收集通过装置 2 的液体。

或者，所述废物收集装置 22 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。在该例中，夹持器 2 由多孔支撑结构 32 构成，例如塑料或金属格栅或多孔烧结塑料片或金属片或其它本领域公知的其它类似装置。一个或多个印迹膜 34 位于支撑物 32 上，其上为如附图 2 的实施例所述的流动分配器 36 和孔结构 38（如果需要）。附图 8 显示了安装在歧管上的附图 2 所示的夹持器，所述歧管在以下附图 4 中描述。

附图 4 显示了歧管 40 的一个优选形式。所述歧管具有基底 42，具有排放管以及放置有夹持器 46（由下部支撑物 48 和上部流动分配器 50 形成）的支撑表面 44。如图所示，夹持器采用铰链 51 将上部和下部相互连接在一起。一个或多个膜插在夹持器 46 的上部和下部之间，然后闭合夹持器。连接至基底 42 上的为一可拆卸的盖子 52。在该实施例中，所述盖子 52 通过枢轴点 53（显示了一个）连接至基底 42 上，从而其可以相对于基底 42 向上和旋转地打开和闭合。在盖子 52 的开口 55 中可以形成一独立的孔 54。优选地如图所示，孔 54 的底部具有向外延伸的基底或凸缘 56，其保持孔 54 位于开口 55 内。另外，孔 54 的大小可以为其 54 和开口 55 之间有较小的摩擦配合，从而使其固定。盖子 52 还具有例如夹子 58 的装置，与基底 42 上的制动器 60 相配合，从而当盖 54 抵着基底 42 旋转进入闭合位置时，可以使盖 52 固定至基底 42。还显示了有可选的控制器 62，用于管理和监测歧管 40 以及该过程。如果需要，所述装置可以与自动液体处理器等一起使用。

在附图 12 所示的另一实施例中，歧管 90 可以处理多于一个的夹持器 94。基底 93 可以设计具有多个基站 92 以定位多个夹持器 94。该实施例中还显示了，如果需要，位于每个基站 92 中的夹持器 94 可以分为两个或多个孔 98。歧管 90 可以具有共用的压力源或每个基站 92 可以为单独通过所示的控制按钮 96 控制压力。所述盖子 100 可以闭合在所有的夹持器上，或者如该实施例，每个基站 92 可以具有独立的盖子。该形式将用于更高通量的实验室的工作台空间降至最低。

所述流动分配器 10 为多孔结构。所述流动分配器不仅提供均匀的液体分布，还作为流量调节器。其提供了完全、均匀的液体分布，允许在膜上停留充足的时间从而使液体分子和样品之间发生适当的反应。在一个实施例中，整个结构都是多孔的。在另一实施例中，例如可以与附图 2 的实施例结合使用，流动分配器 10 仅仅在孔 12 的区域内多孔。可以通过以下方式在分配器 10 上提供无孔的区域 16：在区域 16 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 16 中的孔塌陷，或形成与孔 12 的外部大小相匹配的分配器 10，并沿着外部尺寸将分配器 10 液体密封在孔 12 的底部（如附图 2 所示）。

流动分配器 10 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或压力的影响下易于移动，其还能够从液体中滤出附聚物、颗粒和其它碎片。

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  $7\text{cm} \times 8\text{cm}$  至  $20\text{cm} \times 20\text{cm}$ 。所述流动分配器优选覆盖整个印迹膜，从而确保试剂完全流过所有的印迹膜。

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 MF 过滤器、膜，例如来自马萨诸塞州 Billerica 的 Millipore 公司的 DURAPORE® 和 MILLIPORE EXPRESS® 微孔膜、例如 POREX® 过滤器的烧结膜等。优选的是膜，尤其是塑料微孔膜。

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。

此外，所述优选的多孔结构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。另一是来自马萨诸塞州 Billerica 的 Millipore 公司的 Millipore EXPRESS®亲水 PES 膜。

所述多孔支撑物 4 可以是简单的筛子、格栅（如附图 1 和 2 所示）、引导流动的格栅、或烧结的多孔结构，例如 POREX®膜，或粗孔或大孔微孔过滤器，例如纺织纸或无纺纸、聚丙烯或聚乙烯布、玻璃垫或纸、或 1-10 微米的微孔过滤器。所述支撑物可以由聚合物、玻璃、陶瓷或包括但不限于金属的金属材料构成，例如不锈钢、钢合金、铝等，所述聚合物例如聚乙烯、聚丙烯、聚砜、聚醚砜、苯乙烯、尼龙等。

附图 10 显示了引导流动格栅 70 形式的多孔支撑物，例如由一系列凹槽 72 和开口 74 组成。开口 74 位于多孔支撑物 70 的外周以内。开口 74 与凹槽 72 流体相通，从而流体收集至凹槽 72 内，并引导通过开口 74。凹槽 72 收集废液并将其传递至开口 74，该开口将液体引向废物腔室或夹持器内的收集盘（歧管）

（未显示）。如果研究人员希望收集一种或多种液体，则收集盘可以位于开口 74 下方的歧管内，以收集废液。附图 11 为格栅 80 的另一实施例，将废液引导至凹槽 82 并从开口 84 中流出。该实施例包括一系列矩形凹槽 82，显而易见可以采用其他设计的凹槽 72 或 82 和开口 74 或 84。所期望的结果是将废液引导至一个开口或一系列开口，所述开口将废液引至收集盘。

支撑物 4 和流动分配器 10 的外边缘可以由与支撑物 4 的相同材料构成。当采用一体的铰链时，其必须由弹性材料构成，例如聚乙烯、聚丙烯、弹性体或一种经冲击改性的材料，例如 ABS、K-树脂等。当采用独立的铰链、夹子、松紧带、粘接膜或其它紧固装置时，根据需要由金属、塑料或弹性体构成。

附图 9A 和 9B 显示了本发明的另一实施例，其中流动分配器 110 为一单独的（如图所示）或优选的多个孔形式 101。支撑物 112 形成为一连接至分配器 110 的孔 114 的壁的独立部件 111。在使用过程中，其可以为摩擦配合或优选为搭扣配合从而可拆卸地将所述结构固定在一起。或者，可以在分配器 110 的底边或含有支撑物 112 的部件 111 的顶表面设置粘接剂，例如粘接垫（未显示），从而将它们结合在一起。具有喷嘴（spout）116 的格栅位于含有支撑物 112 的所述部件 111 的底部。膜 118 位于支撑物 112 的顶部，其然后与流动分配器 110

连接。具有孔的装置 101 放置在压力或真空歧管 120 上或之内，所述歧管具有一收集装置，例如废物盘或多孔盘或一系列一个或多个管（如图所示），以收集通过系统的液体。

在本发明中可以采用各种方法。关键因素是这些方法均依赖于通过真空或正压驱动液体过滤使其到达具有大的内表面积膜，从而允许所有分子在整个深度上进行三维的相互作用，而过去是在表面上发生二维的相互作用。

最简单的方法是采用本发明实施一个或多个洗涤循环。典型地，每个洗涤循环包括一个或多个洗涤步骤。通过，每个循环为 2-5 个步骤。

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。

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。

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™<sub>HTS</sub>。

通常，正压由压力为大约 2psi 至大约 15psi 的 air 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。

为了使用本发明的装置，简单地采用一夹持器，打开它，将印迹膜放在一个表面上，当环绕着膜关闭所述装置时，印迹膜的下表面邻近多孔支撑物，印迹膜的上表面邻近流动分配器，从而印迹和流动分配器之间没有空气泡。两个表面之间的气泡会产生没有流动的区域。所述装置放置在具有压力源（真空或正压）的歧管上或之内。优选地，印迹膜预先湿润。打开压力（真空或正压），将液体例如洗液或试剂置于流动分配器上或进入孔中（如果使用）。持续所述压力，直至液体通过所述装置和膜。然后关闭压力。

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，可以采用具有多个小孔的流动分配器，以及采用相互平行的多于一个的印迹膜，根据特定目的所要求，每个膜在流动分配器上均具有各自的孔以及具有各自的一组试剂。还可以安装一个或多个独立夹持器，每个夹持器具有一个或多个小孔。如果需要，甚至在相邻孔中可以采用多层。采用两个或多个独立夹持器，如果需要，每个夹持器也可以独立操作或一起操作。

可以在压力源关闭或打开的条件下加入所述液体，从而使液体进入膜，并进行孵化（例如需要与第一或第二抗体）。然后打开所述压力，从而顺序地除去液体和/或用另一使用的液体代替所述液体。优选地，在洗涤过程中，保持真空，并顺序加入剩余的洗液。

可选地，如果希望，可以将收集容器70放在装置下方，优选位于歧管内或下游。然后用其收集一种或多种未结合的可能较为昂贵的试剂，所述试剂可以收集并在以后的测定中重复使用。所述容器还可以分为多个对齐的腔室，所述腔室与印迹膜的各个部分分别流体连接。附图7显示了一个所述收集容器70，具有中央收集点72和与支撑物4的下游表面相匹配的支撑肋条74。还可以采用其它实施例。

另外或供选择的，可以将一吸收基质放于夹持器下方的流动通路的下游，其能够可逆性地结合一种或多种未结合的昂贵的试剂。所述基质优选为整体料，例如垫、塞子或纸张，其位置使得所有通过印迹膜和夹持器的液体通过基质。然后其可以被移走并洗提试剂，如果需要，在印迹膜完成测定之后，可以在原位洗提结合的试剂。

其它方法也可以与本发明的装置一起使用。

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；或者各种其它的聚合物膜，例如聚偏氟乙烯（PVDF），例如马萨诸塞州Billerica的Millipore公司售的immobilon™

膜。

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。

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、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。

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，然后通过通过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。

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）或系统中使用的液体来实现。

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）。

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，并且用标记适当的探针如抗体、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膜上或者其它支撑物(典型地为阵列形式)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。

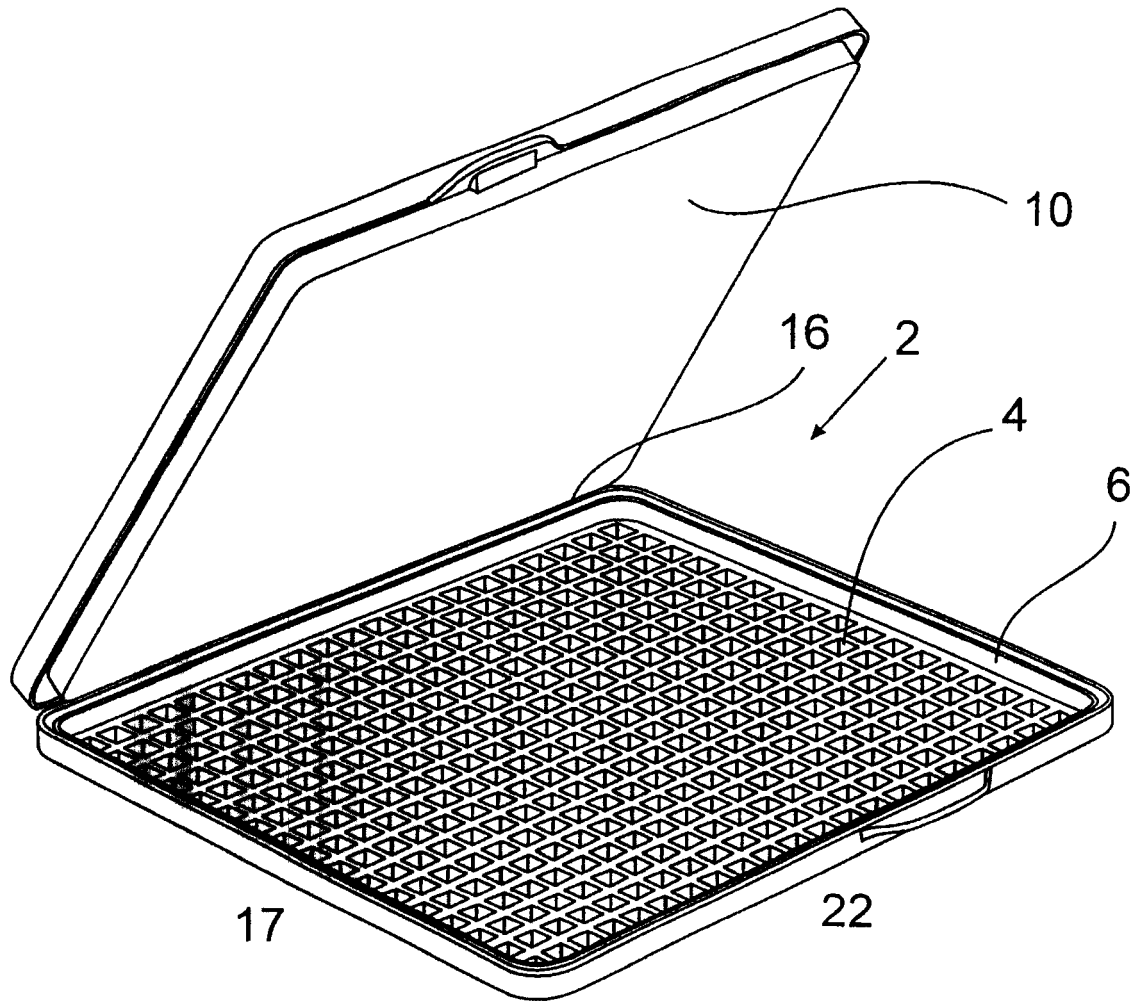


图1

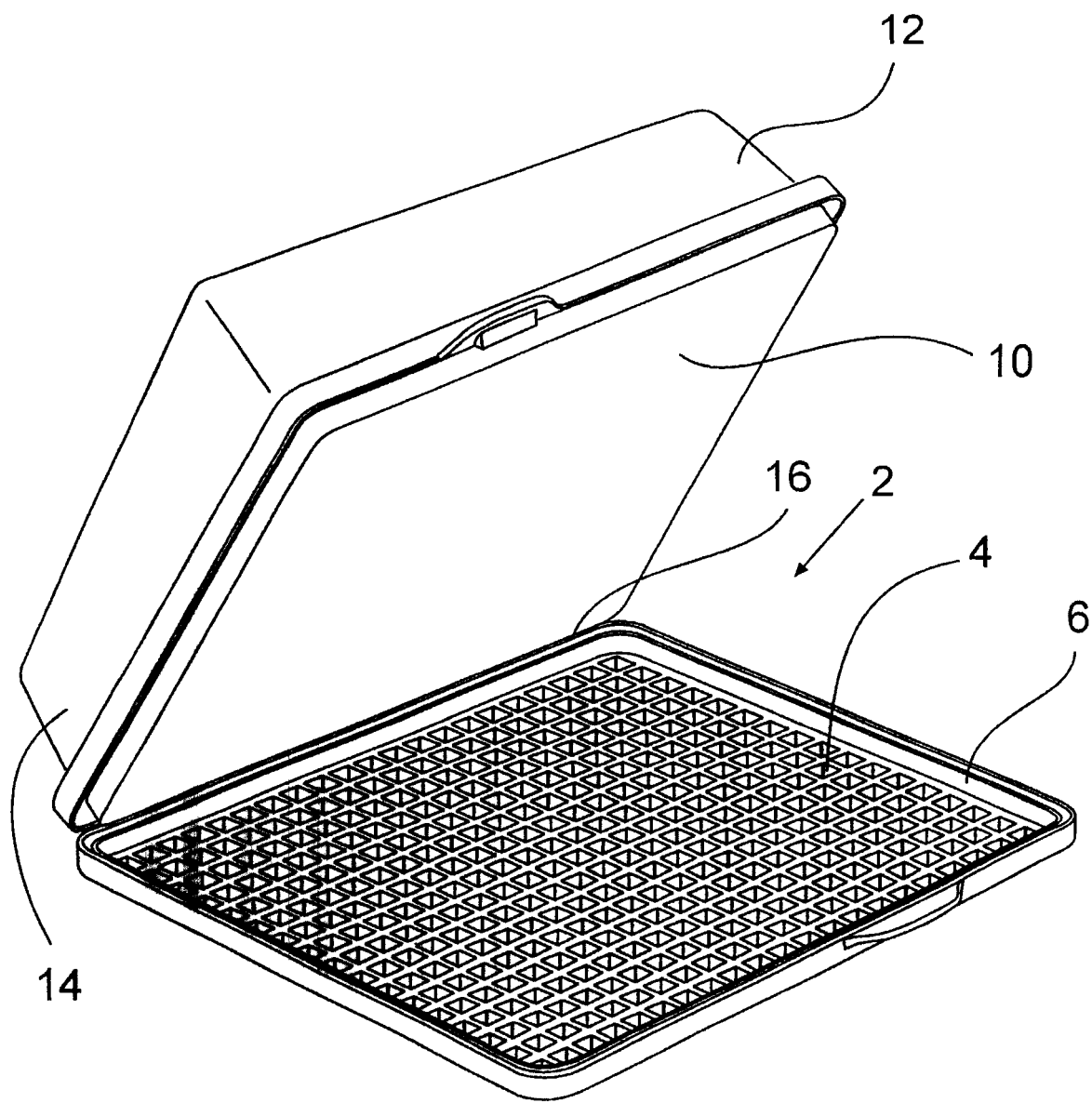


图2

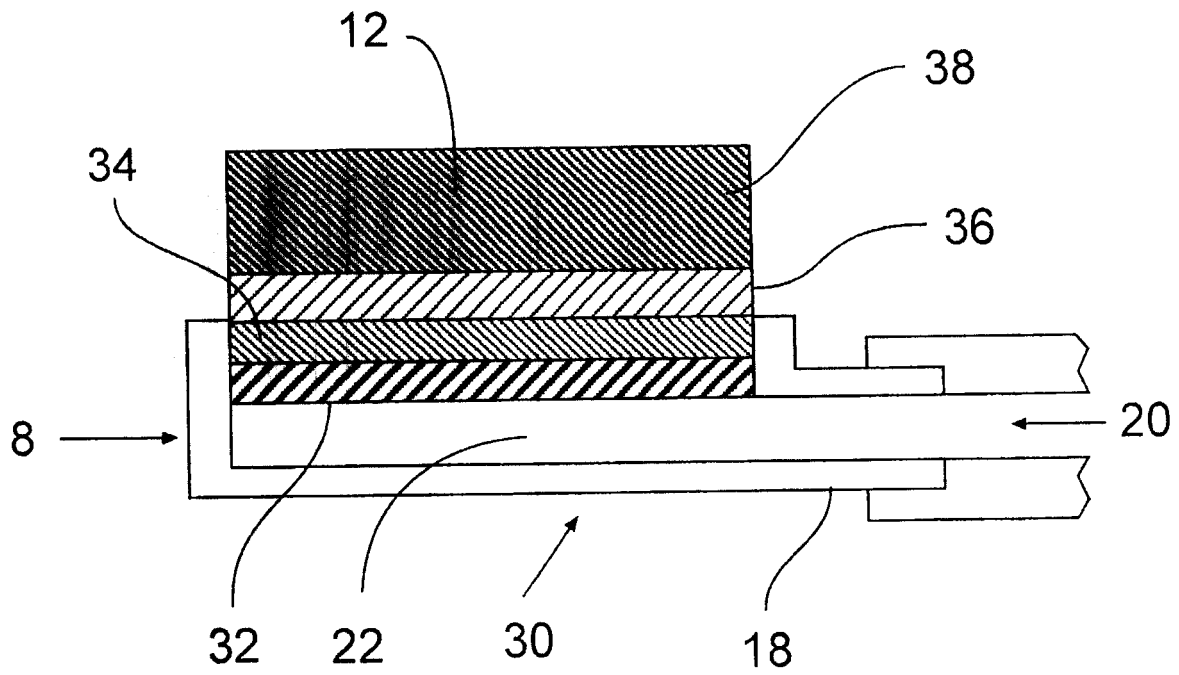


图3

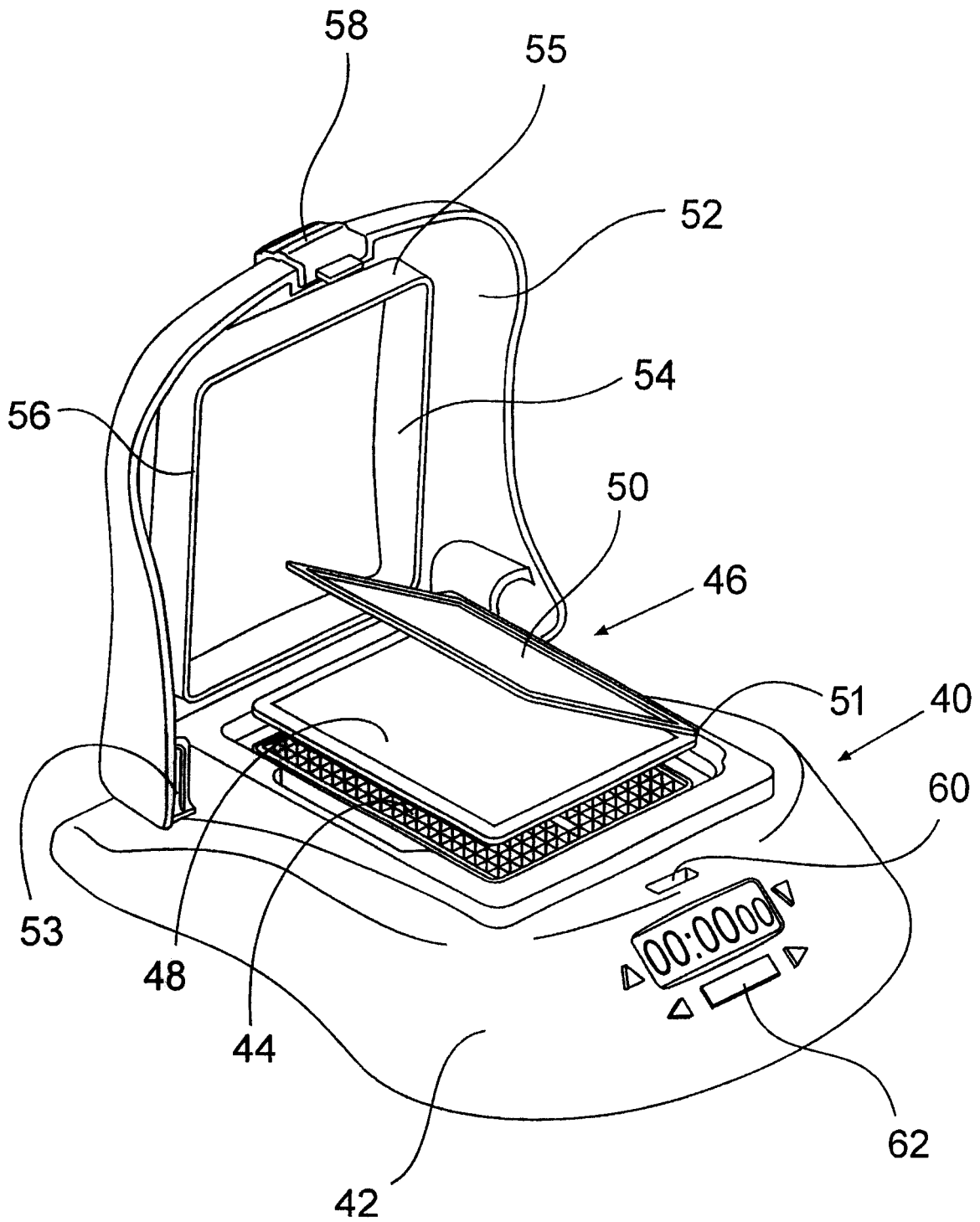


图4

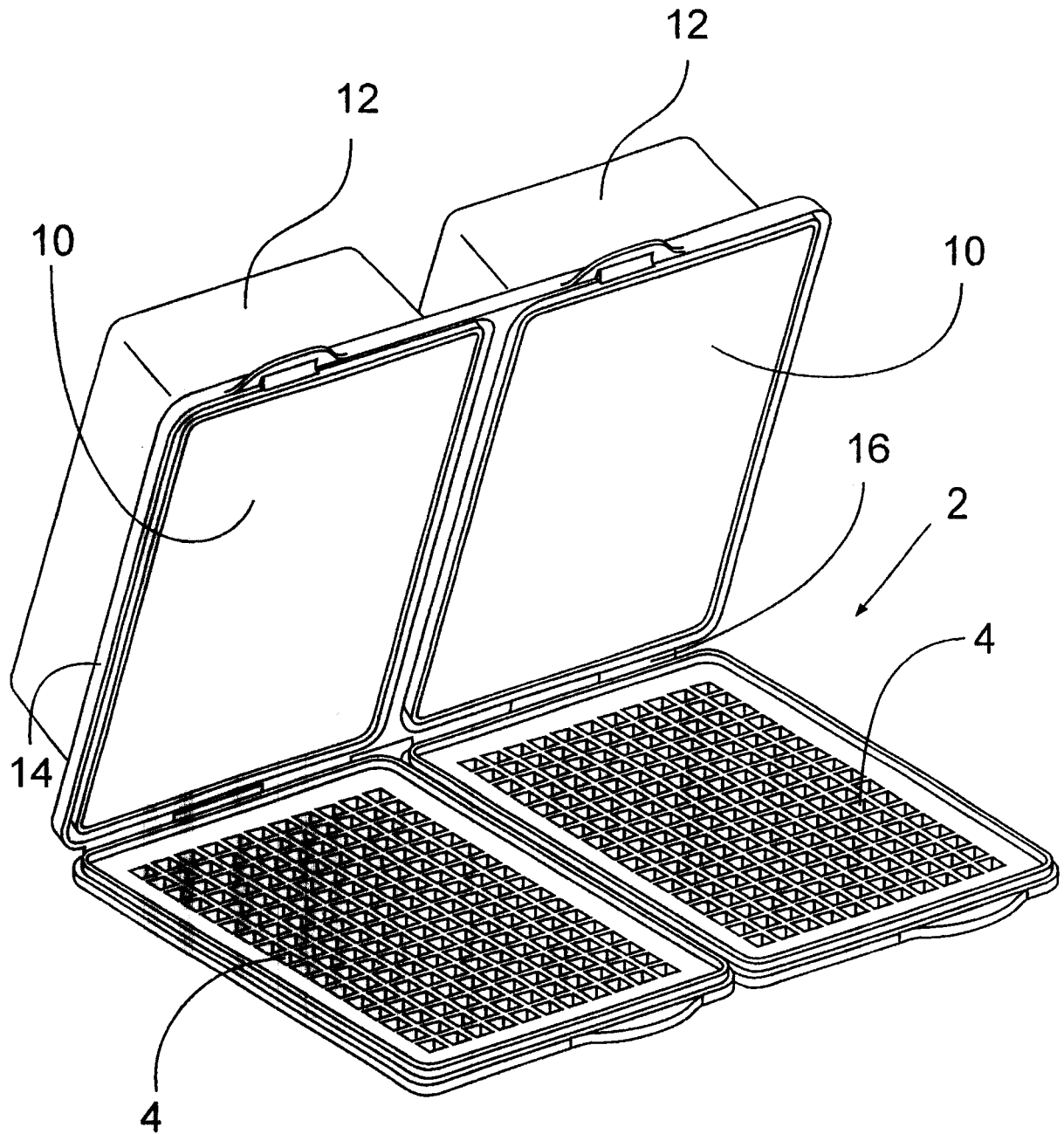


图5

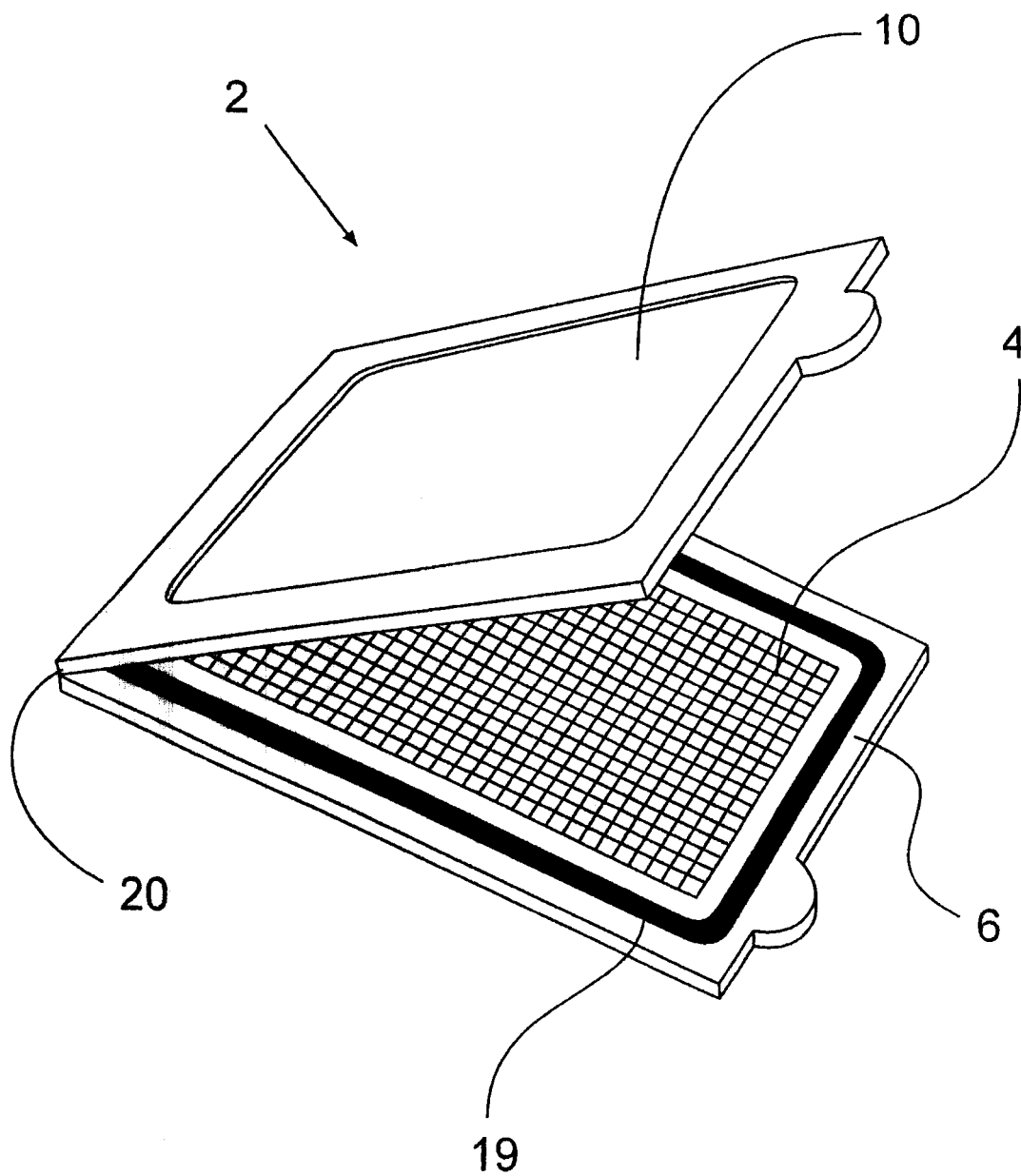


图6

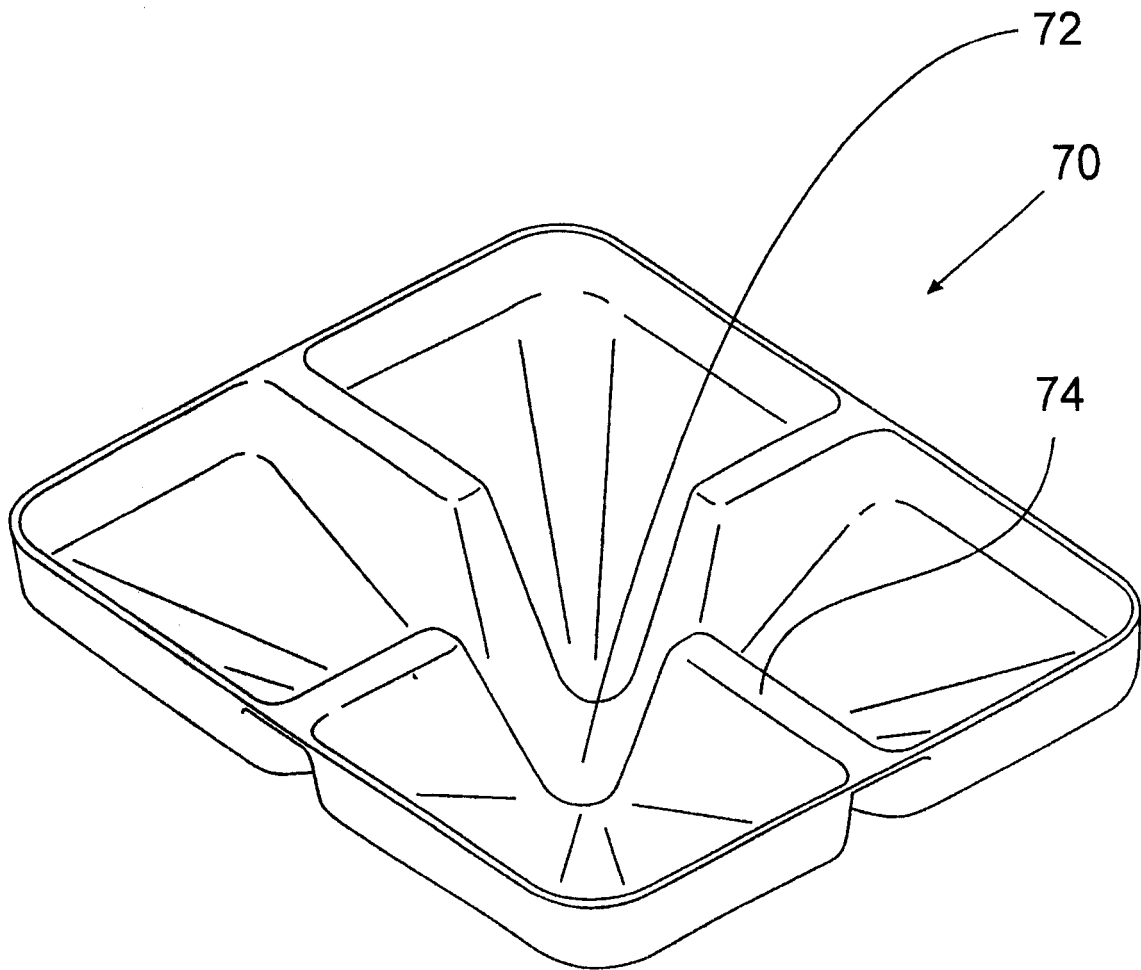


图7

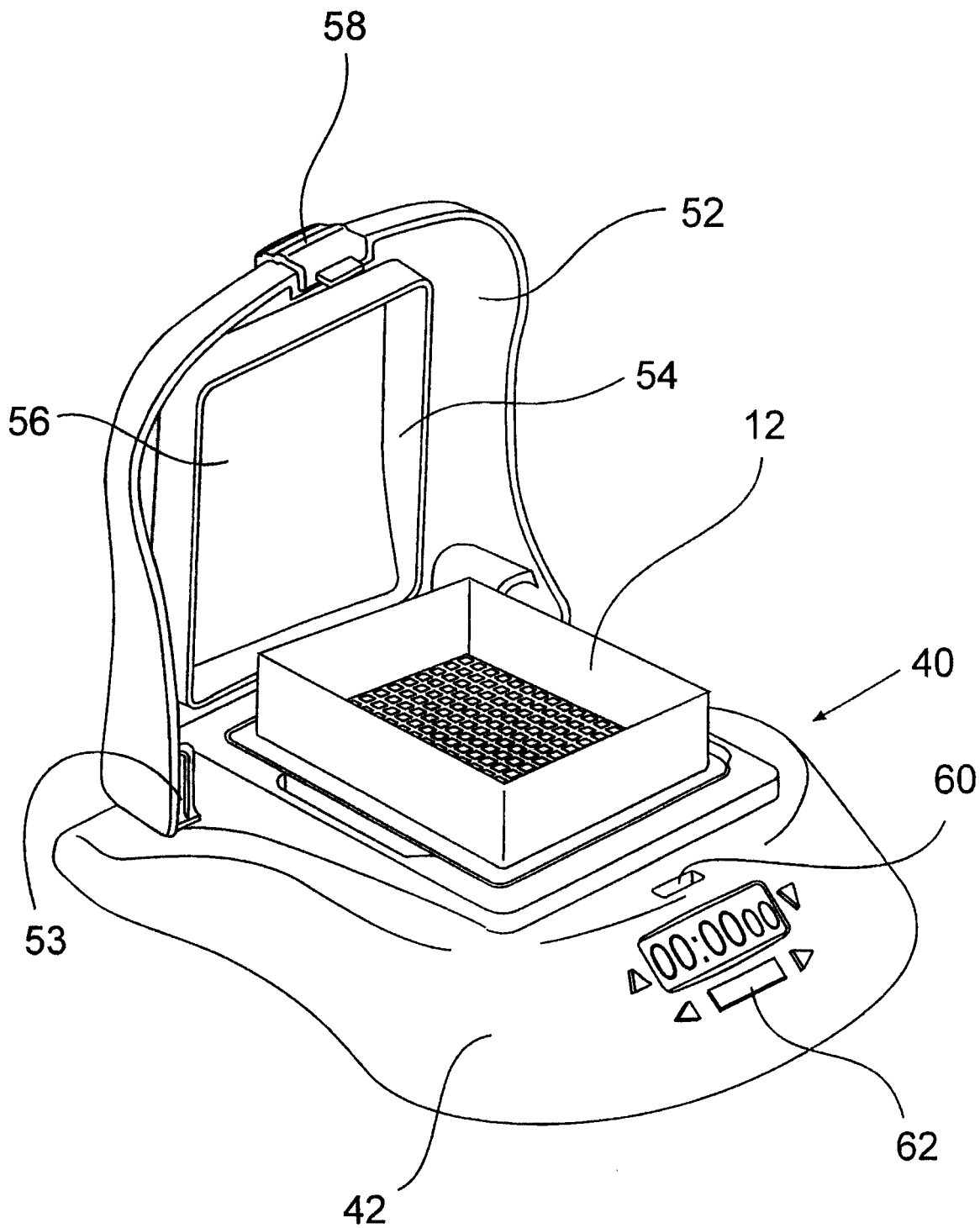


图8

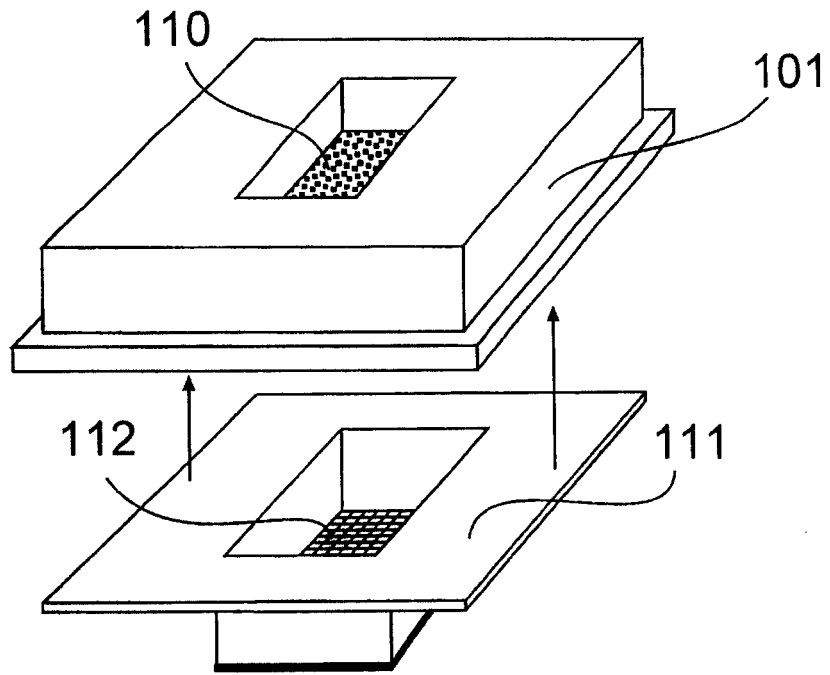


图9A

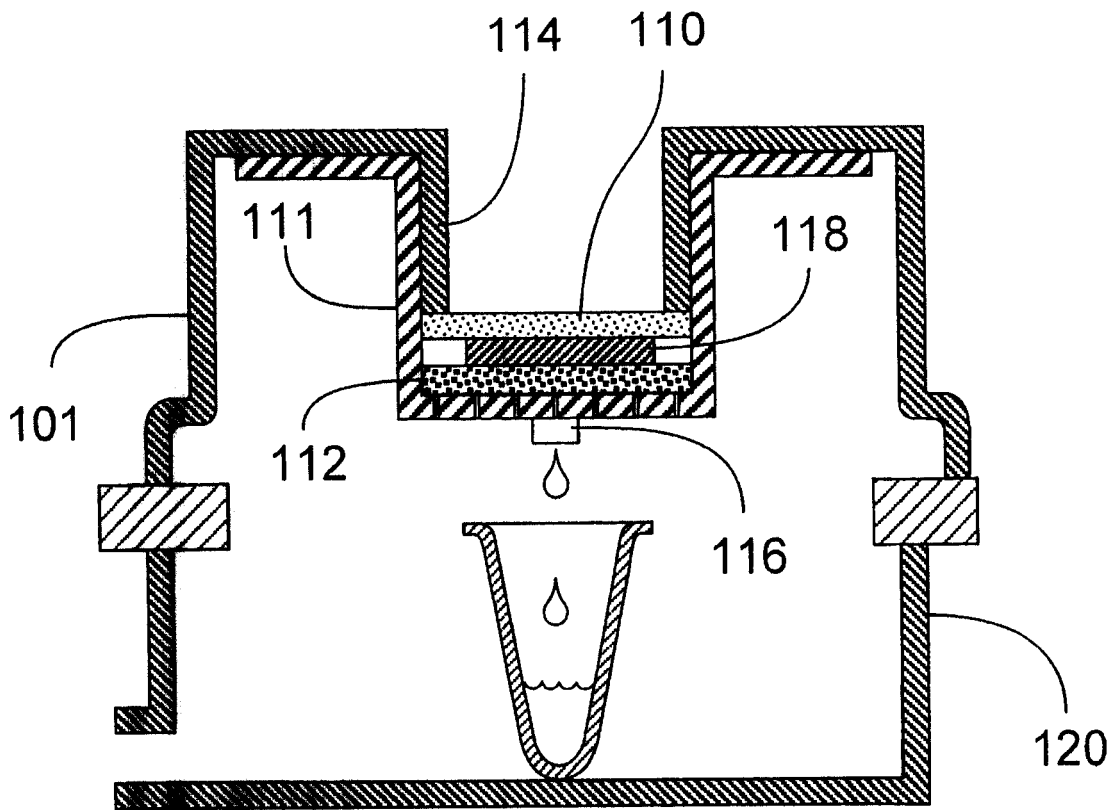


图9B

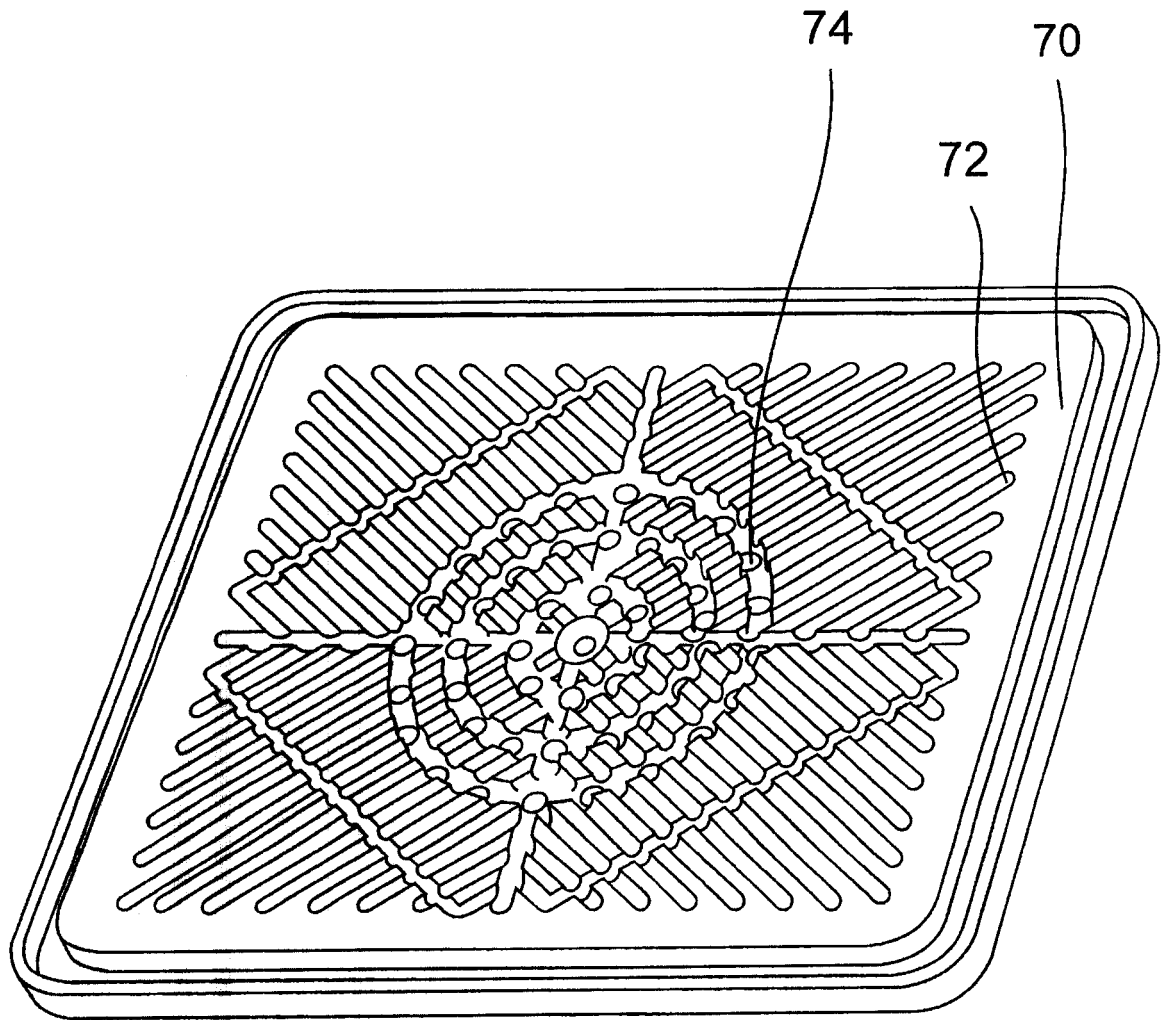


图10

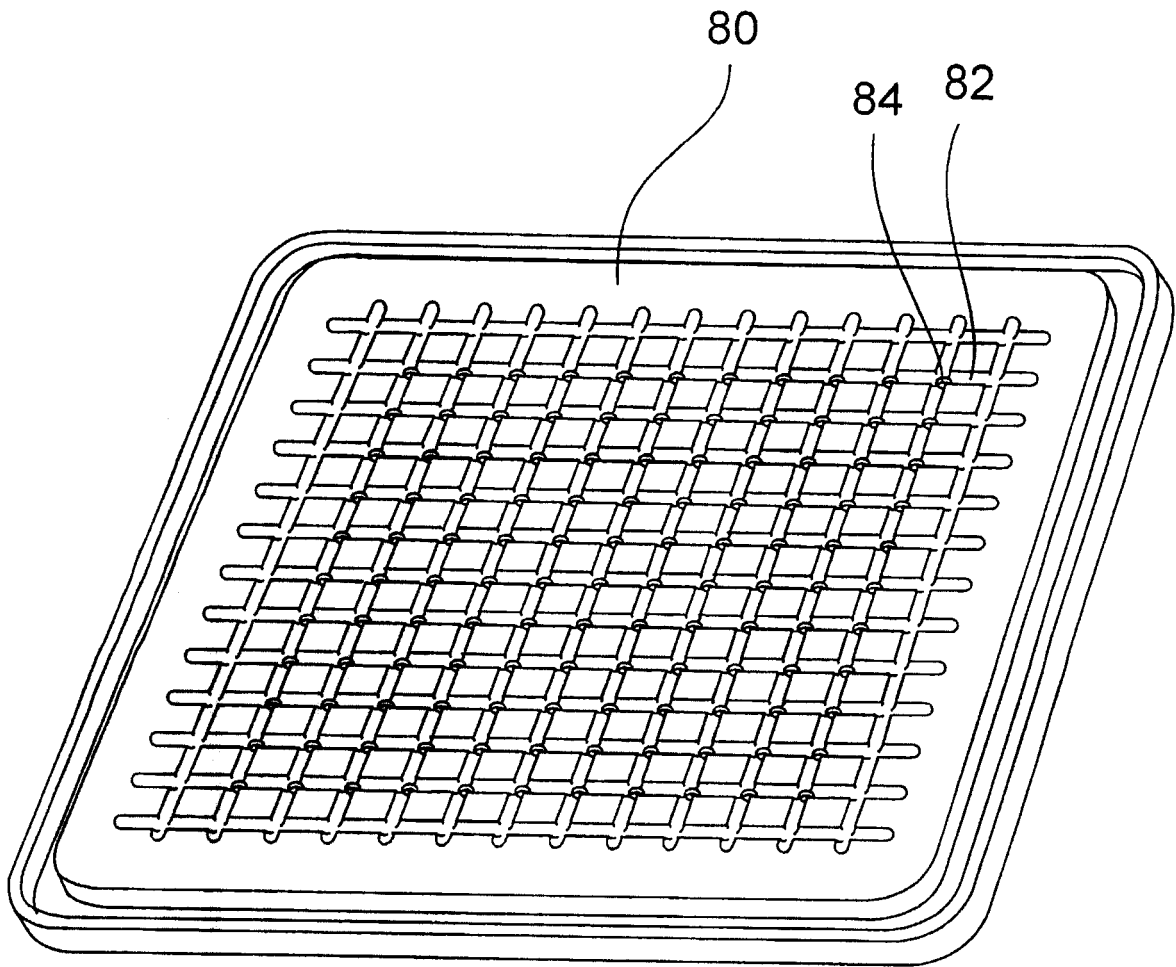


图11

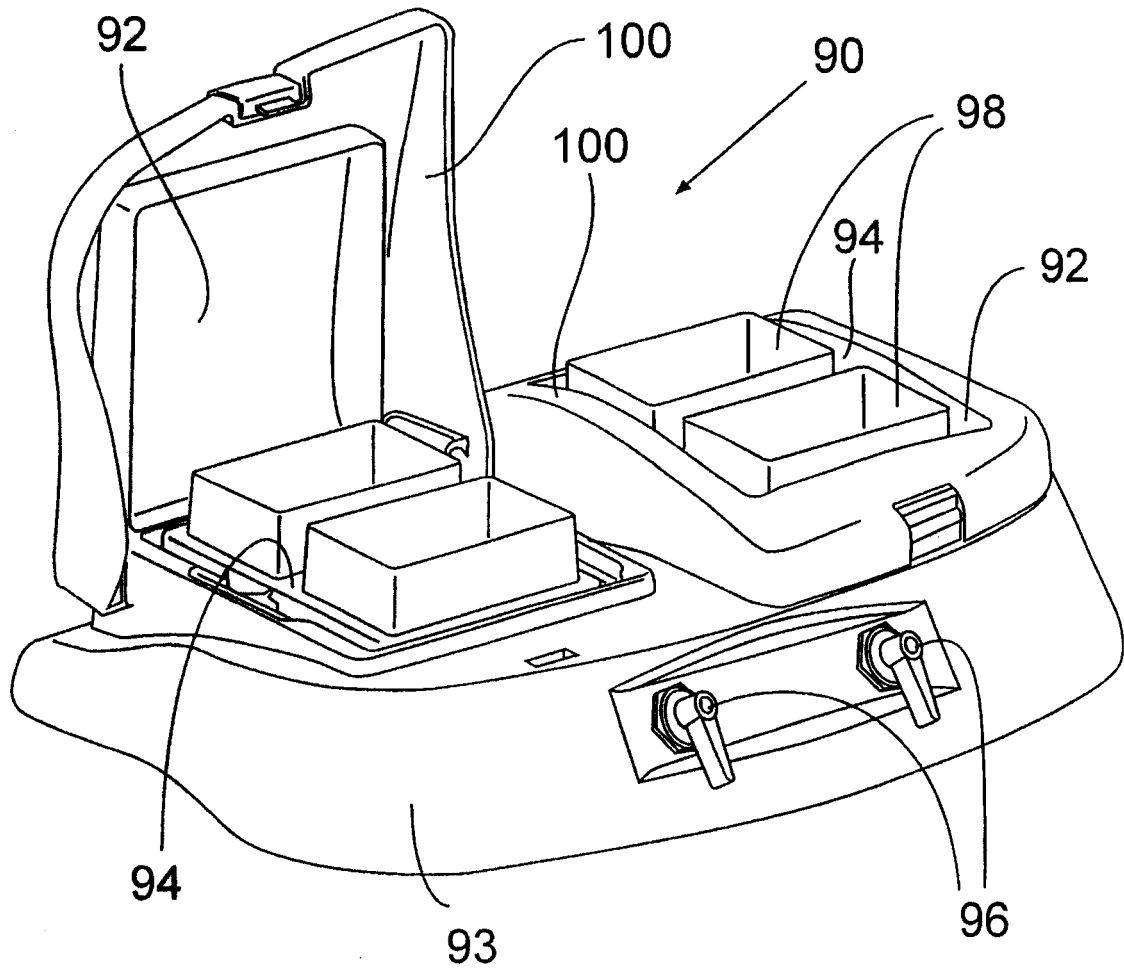


图12

专利名称(译)	免疫产品及方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN1979164A</a>	公开(公告)日	2007-06-13
申请号	CN200610064776.5	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)	米利波尔公司		
[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	60/732994 2005-11-03 US 60/795452 2006-04-27 US 60/795532 2006-04-27 US		
其他公开文献	CN1979164B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种用于检测印迹膜上化合物的装置。所述装置由若干层组成，包括印迹膜下方的多孔支撑物层，印迹膜上方的流动分配器，以及可选的位于流动分配器上使液体至所希望区域的孔，所述孔允许所述液体具有非常小的起始体积。优选地，所述流动分配器为无结合的或低结合的亲水多孔膜，例如0.22微米的膜，所述支撑物为一格栅或烧结的多孔材料。所述分配器和支撑物结合在一起，并在膜周围形成外壳。优选采用铰链、夹子和其他类似装置来实现。

